

VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ

Fakulta chemická

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

Brno, 2017

Barbora Beránková



VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ

BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY

FAKULTA CHEMICKÁ

FACULTY OF CHEMISTRY

ÚSTAV FYZIKÁLNÍ A SPOTŘEBNÍ CHEMIE

INSTITUTE OF PHYSICAL AND APPLIED CHEMISTRY

CENTRIFUGAČNÍ ANALÝZA MIKROBIÁLNÍCH BUNĚK

ANALYTICAL CENTRIFUGATION AS A TOOL FOR CHARACTERIZATION OF MICROBIAL CELLS

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

BACHELOR'S THESIS

AUTOR PRÁCE

AUTHOR

Barbora Beránková

VEDOUCÍ PRÁCE

SUPERVISOR

doc. Ing. Stanislav Obruča, Ph.D.

BRNO 2017

Zadání bakalářské práce

Číslo práce: FCH-BAK1129/2016
Ústav: Ústav fyzikální a spotřební chemie
Studentka: **Barbora Beránková**
Studijní program: Chemie a chemické technologie
Studijní obor: Chemie pro medicínské aplikace
Vedoucí práce: **doc. Ing. Stanislav Obruča, Ph.D.**
Akademický rok: 2016/17

Název bakalářské práce:

Centrifugační analýza mikrobiálních buněk

Zadání bakalářské práce:

1. Rešerše na zadané téma
2. Experimentální stanovení sedimentačního potenciálu mikrobiálních buněk v závislosti na kultivačních podmínkách

Termín odevzdání bakalářské práce: 19.5.2017

Bakalářská práce se odevzdává v děkanem stanoveném počtu exemplářů na sekretariát ústavu. Toto zadání je součástí bakalářské práce.

Barbora Beránková
student(ka)

doc. Ing. Stanislav Obruča, Ph.D.
vedoucí práce

prof. Ing. Miloslav Pekař, CSc.
vedoucí ústavu

V Brně dne 31.1.2017

prof. Ing. Martin Weiter, Ph.D.
děkan

ABSTRAKT

Tato bakalářská práce se zabývá studiem centrifugačního potenciálu mikroorganismů v závislosti na kultivačních podmínkách. V experimentální části byla sledována především rychlost sedimentace a index nestability studovaných mikroorganismů během růstu, při působení teplotního a solného stresu, vliv složení média na centrifugaci a působení vody na halofilní bakterii *Haloferax mediterranei*. S klesající osmotickou silou v bakteriální kultuře *Haloferax mediterranei* roste rychlost sedimentace a index nestability. Při sledování růstu bakterií *Cupriavidus necator* H16, *Cupriavidus necator* PHB⁻⁴, *Haloferax mediterranei*, *Burkholderia cepacia* a *Burkholderia sacchari* hraje roli při rychlosti sedimentace a indexu nestability přítomnost a typ polyhydroxyalkanoátu (PHA) v bakteriální biomase. Bakterie *Cupriavidu necator* H16 s nejvyšším přítomným obsahem poly(3-hydroxybutyrátu) byla nejrychleji sedimentující a nejvíce nestabilní ze sledovaných bakterií. Bakterie *Cupriavidus necator* H16 a její PHA neprodukující mutant *Cupriavidus necator* PHB⁻⁴, vystavené teplotnímu a solnému stresu, vykazovaly při teplotním stresu pouze nepatrný vliv na rychlost sedimentace a nestabilitu. U solného stresu s rostoucí koncentrací roztoku NaCl v kultuře klesala rychlost sedimentace a index nestability. Při porovnávání vlivu složení média na polyhydroxyalkanoáty (PHA) produkující bakterie, *Cupriavidus necator* H16 kultivovaná v minerálním (produkčním) médiu vykazovala nejnižší rychlost sedimentace a index nestability, přičemž *Cupriavidus necator* PHB⁻⁴ dosahovala nejnižší rychlosti sedimentace a indexu nestability při kultivaci v Nutrient Broth médiu. U kvasinky *Saccharomyces cerevisiae* měla volba média pouze nepatrný vliv na rychlost sedimentace a index nestability.

KLÍČOVÁ SLOVA

Polyhydroxyalkanoáty, analytická centrifuga, index nestability, rychlost sedimentace, *Cupriavidus necator* H16, *Cupriavidus necator* PHB⁻⁴, *Haloferax mediterranei*, *Burkholderia cepacia*, *Burkholderia sacchari*, *Saccharomyces cerevisiae*

ABSTRACT

This bachelor thesis deals with the study of centrifugation potential of microorganisms depending on the cultivation conditions. The experimental part focuses on the sedimentation velocity and the instability index of the studied microorganisms during growth, under temperature and salt stress, the influence of the medium composition on centrifugation and the effect of osmotic strength on halophilic microbe *Haloferax mediterranei*. The sedimentation velocity and the instability index are increasing with increasing amount of water present in the bacterial culture of *Haloferax mediterranei*. The presence and type of polyhydroxyalkanoate (PHA) play a role in the monitoring of growth of bacteria *Cupriavidus necator* H16, *Cupriavidus necator* PHB⁻⁴, *Haloferax mediterranei*, *Burkholderia cepacia* and *Burkholderia sacchari* at the rate of sedimentation and instability index. Bacteria *Cupriavidus necator* H16 with the highest content of poly(3-hydroxybutyrate) present was the fastest sedimentating and most unstable of the bacteria studied. Bacteria *Cupriavidus necator* H16 and *Cupriavidus necator* PHB⁻⁴, exposed to temperature and salt stress, exhibited only a slight influence on the rate of sedimentation and instability under temperature stress. The sedimentation velocity and instability index decreased with saline stress with increasing concentration of NaCl solution in culture. When comparing the media composition to polyhydroxyalkanoate (PHA) producing bacteria, *Cupriavidus necator* H16 cultivated in the mineral medium demonstrated the lowest sedimentation velocity and instability index rates, but *Cupriavidus necator* PHB⁻⁴ reached the lowest sedimentation velocity and instability index when grown in Nutrient Broth medium. For yeast *Saccharomyces cerevisiae*, the choice of medium had only a slight effect on sedimentation velocity and instability index.

KEYWORDS

Polyhydroxyalkanoates, analytical centrifuge, instability index, velocity, *Cupriavidus necator* H16, *Cupriavidus necator* PHB⁻⁴, *Haloferax mediterranei*, *Burkholderia cepacia*, *Burkholderia sacchari*, *Saccharomyces cerevisiae*

BERÁNKOVÁ, B. *Centrifugační analýza mikrobiálních buněk*. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2017. 60 s. Vedoucí bakalářské práce doc. Ing. Stanislav Obruča, Ph.D..

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem bakalářskou práci vypracovala samostatně a že všechny použité zdroje jsem správně a úplně citovala. Bakalářská práce je z hlediska obsahu majetkem Fakulty chemické VUT v Brně a může být využita ke komerčním účelům jen se souhlasem vedoucího bakalářské práce a děkana FCH VUT.

.....
podpis studenta

Poděkování

Tímto bych chtěla poděkovat vedoucímu mé bakalářské práce doc. Ing. Stanislavu Obručovi, Ph.D. a Ing. Pavle Benešové za cenné rady, ochotu, trpělivost a pomoc při práci v laboratoři. Dále bych ráda poděkovala Ing. Leoši Doskočilovi, Ph.D. za pomoc při analýze a vyhodnocování dat z analytické centrifugy. Velké poděkování také patří mému manželovi, rodině a přátelům za podporu nejen při psaní bakalářské práce, ale také během celého mého studia.

OBSAH

1	ÚVOD	8
2	TEORETICKÁ ČÁST	9
2.1	Biotechnologie	9
2.2	Bakterie	10
2.2.1	Stavba	10
2.2.2	Tvar bakterií	10
2.2.3	Rozmnožování	11
2.2.4	Složení buněčné stěny	12
2.2.5	Zdroj energie a uhlíku	13
2.2.6	Využití bakterií	13
2.3	Polyhydroxyalkanoáty	14
2.3.1	Typy PHA	14
2.3.2	Využití PHA	15
2.3.3	Bakterie produkující PHA	15
2.4	Kvasinky	16
2.4.1	Stavba	16
2.4.2	Tvar kvasinek	16
2.4.3	Rozmnožování	16
2.4.4	Využití kvasinek	18
2.5	LUMiSizer	19
2.5.1	Analytická centrifugační odstředivka	19
2.5.2	Princip měření LUMiSizeru	19
2.5.3	Průmyslová využitelnost	20
3	EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	21
3.1	Použité chemikálie, mikroorganismy a přístroje	21
3.1.1	Použité mikroorganismy	21
3.1.2	Chemikálie pro kultivaci	21
3.1.3	Přístrojové vybavení	21
3.2	Kultivace mikroorganismů	21
3.2.1	Příprava inokula	21
3.2.2	Živné médium	22
3.2.3	Kultivace bakterií za účelem produkce PHA	22
3.2.4	Kultivace kvasinky <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	24
3.3	Stanovení biomasy	24
3.3.1	Gravimetrické stanovení biomasy	24
3.3.2	Spektrofotometrické stanovení biomasy	24
3.4	Stanovení PHA pomocí plynové chromatografie s FID	25
3.4.1	Stanovení kalibrační přímky	25
3.4.2	Příprava vzorků pro plynovou chromatografii	25
3.5	Stanovení sedimentačního potenciálu	25
3.5.1	Příprava vzorků	25

3.5.2	Působení vody na bakterii <i>Haloferax mediterranei</i>	25
3.5.3	Sledování růstu bakterií	26
3.5.4	Působení stresových faktorů na bakterie	26
3.5.5	Vliv složení média na centrifugaci PHA produkujících bakterií	26
3.5.6	Sledování růstu kvasinky <i>Saccharomyces cerevisiae</i> v různých médiích	27
4	VÝSLEDKY A DISKUZE	28
4.1	Působení vody na bakterii <i>Haloferax mediterranei</i>	28
4.1.1	Kalibrace metod	28
4.1.2	Stanovení rychlosti sedimentace	29
4.1.3	Stanovení indexu nestability	30
4.2	Sledování růstu bakterií	31
4.2.1	Kalibrace metod	31
4.2.2	Stanovení obsahu PHA v biomase	34
4.2.1	Stanovení rychlosti sedimentace	36
4.2.2	Stanovení indexu nestability	38
4.3	Působení stresových faktorů na bakterie	41
4.3.1	Kalibrace metod	41
4.3.2	Stanovení obsahu PHA v biomase	42
4.3.3	Působení teplotního stresu na bakterie	42
4.3.4	Působení stresu mrazem na bakterie	44
4.3.5	Působení solného stresu na bakterie	45
4.4	Vliv složení média na centrifugaci PHA produkujících bakterií	48
4.4.1	Kalibrace metod	48
4.4.2	Stanovení rychlosti sedimentace	49
4.4.3	Stanovení indexu nestability	50
4.5	Sledování růstu kvasinky <i>Saccharomyces cerevisiae</i> v různých médiích	51
4.5.1	Kalibrace metod	51
4.5.2	Stanovení rychlosti sedimentace	52
4.5.3	Stanovení indexu nestability	52
5	ZÁVĚR	54
6	SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY	56
7	SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK	60
8	PŘÍLOHA	61

1 ÚVOD

Mikroorganismy se vyskytují všude kolem nás. Právě mikroorganismy hrají velký význam ve farmaceutickém průmyslu, kdy díky mikroorganismům máme dostupné určité druhy léků a případná dříve neléčitelná onemocnění jsou v dnešní době již léčitelná. Důležité uplatnění nacházejí i v zemědělském průmyslu, protože díky mikroorganismům se mohou stát zemědělské plodiny odolnějšími vůči herbicidům a pesticidům. V potravinářském průmyslu se mikroorganismy podílejí na výrobě kysaných mléčných výrobků, pečiva či alkoholických nápojů. V posledních desítkách let nacházejí mikroorganismy uplatnění i při výrobě biopaliv. Celosvětovým problémem je velké množství odpadků, které se v lepším případě pouze dlouho rozkládají, avšak ve většině případů jsou odpady zcela nerozložitelné, proto se hledá nový směr, jak Zemi pomoci. Velký rozmach tudíž zažívá výroba různých biologicky rozložitelných obalů.

Polyhydroxyalkanoáty (PHA) jsou přírodní polyestery, jejich velkou výhodou je biodegradabilita a biokompatibilita, svými vlastnostmi jsou velmi podobné syntetických polymerům, plastům. PHA jsou syntetizovány a uloženy v bakteriálních buňkách ve formě intracelulárních granulí.

Aby bakterie a kvasinky mohly být podrobně studovány, je potřebné vědět co nejvíce o jejich vlastnostech. Mezi tyto vlastnosti patří i sedimentace. Každá částice se usazuje různou rychlostí, jiným způsobem a s rozdílným indexem nestability. Způsob usazování je ovlivňován několika faktory, mezi ty nejdůležitější patří velikost částic, hustota jak částic, tak i hustota prostředí, dále to, jak se částice v prostředí během sedimentace chová, ale také, o jaký typ částice se jedná.

Cílem mé bakalářské práce je experimentální stanovení sedimentačního potenciálu mikroorganismů v závislosti na kultivačních podmínkách. Studovala jsem bakterie produkující polyhydroxyalkanoáty a kvasinku *Saccharomyces cerevisiae*, jejíž sedimentace hraje významnou roli v mnoha biotechnologických procesech. Zajímavé bylo sledování bakterií *Cupriavidus necator* H16 a *Cupriavidus necator* PHB⁻⁴. Tyto dvě bakterie jsou stejné, pouze bakterie *Cupriavidus necator* PHB⁻⁴ je mutantním druhem bakterie *Cupriavidus necator* H16, a tedy neprodukuje polyestery polyhydroxyalkanoáty, které jsou jinak obsaženy ve studovaných bakteriálních buňkách. Porovnávala jsem i bakterie *Burkholderia cepacia* a *Burkholderia sacchari*, které jsou stejného rodu, *Burkholderia*, ale přesto se liší. Měla jsem možnost pracovat i s extrémně halofilní bakterií *Haloferax mediterranei*. Při bakalářské práci jsem se naučila pracovat s moderním přístrojem, analytickou odstředivkou LUMiSizer. Právě s touto analytickou odstředivkou se často v klasické laboratoři nesetkáme, avšak její využití je ohromné. Analytická odstředivka umožňuje snadným způsobem velmi podrobné prostudování jednotlivých buněk a důkladné porovnání jejich vlastností.

2 TEORETICKÁ ČÁST

2.1 Biotechnologie

Biotechnologie je oblast aplikované biologie, která zahrnuje použití živých organismů a biologických procesů. Biotechnologie využívá poznatky z nejrůznějších oborů nejen z biologie, včetně mikrobiologie, biochemie, genetiky, bioinformatiky, ale také z chemického inženýrství [1]. Biotechnologie umožňuje výrobu z biologicky obnovitelných surovin namísto ropy nebo zemního plynu [2]. Existuje několik klasifikací biotechnologií, ale nejvíce používané je dělení podle barevného kódu. Využívají se čtyři základní barvy – zelená, červená, bílá a modrá biotechnologie [1,3].

Zelená biotechnologie se uplatňuje v zemědělství, kde se zabývá pěstováním plodnějších a stresově odolnějších rostlin, používáním ekologicky šetrnějších hnojiv a využíváním biopesticidů [1,3]. Velké uplatnění nachází zelená biotechnologie při přípravě zemědělských plodin odolných vůči herbicidům či pesticidům, tyto zemědělské plodiny bývají často různě geneticky upravovány, aby odolávaly nepříznivým vlivům [1]. V Evropské Unii mohou být v současné době uváděny na trh geneticky modifikované produkty z bavlníku, kukuřice, brambor, řepky, cukrové řepy, bakterie a kvasinky. Tyto geneticky modifikované (GM) plodiny jsou odolné vůči herbicidům nebo určitým druhům škůdců [4]. V České republice je možné pěstovat na produkčních plochách geneticky modifikované plodiny, které prošly schvalovacím procesem v EU a jejich GM odrůdy byly zapsány do společného evropského katalogu odrůd. Momentálně je tedy povolena Bt kukuřice, která je vytvořena vložením genu z půdní bakterie *Bacillus thuringiensis* a GM brambory Amflora, určené, díky pozměněnému poměru škrobových složek, k efektivnímu využití v průmyslových odvětvích, např. výroba papíru, textilií [5].

Červená biotechnologie souvisí s výzkumem léků a lékařských procesů, jako je výroba antibiotik, očkovacích látek, ale i genomové manipulace nebo vytváření umělých orgánů [1,3]. Zaměřuje se na vývoj produktů, které mají být využívány nebo se vztahují k lékařským účelům. Často je červená biotechnologie definována jako lékařská biotechnologie. Hlavním předmětem výzkumu je vývoj biologických nebo biologických produktů (např. protilátky), stejně jako genetické modifikace mikroorganismů, zvířat nebo rostlin k výrobě léčivých přípravků [2].

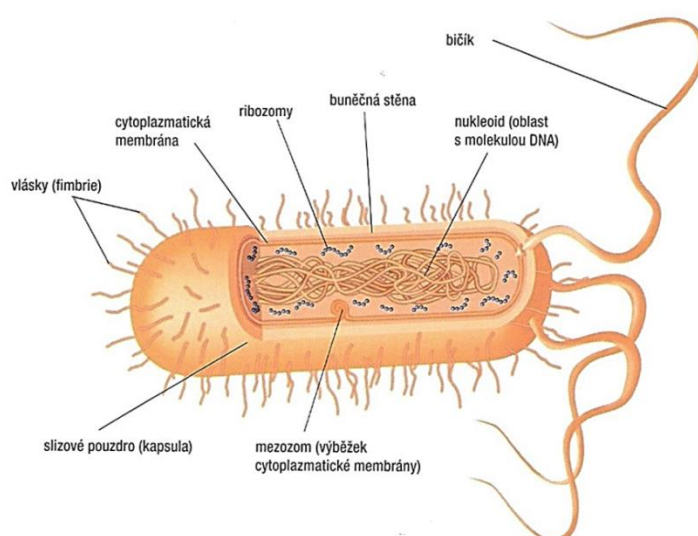
Bílá biotechnologie zahrnuje průmyslové procesy využívající mikroorganismy pro zpracování a výrobu chemických látek, materiálů a energii včetně biopaliv. Bílá biotechnologie je považována za největší větev biotechnologie [1,3]. Bílá biotechnologie zažívá velký rozmach především z důvodů omezených zásob ropy a rostoucích nákladů v důsledku její těžby, proto se hledají nová východiska a využívá se převážně biomasa jako surovina pro výrobu biopaliv a chemikálií [2]. I Evropská komise se rozhodla bílou biotechnologií podpořit, výhodou bílé biotechnologie je možné využití obnovitelných zdrojů [6]. Někdy se bílá biotechnologie skládá ještě z podskupiny šedá biotechnologie, která se zabývá nakládáním s odpady [2].

Modrá biotechnologie je založena na výzkumu mořských a sladkovodních organismů. Voda pokrývá téměř 75 % zemského povrchu, proto je tento ekosystém domovem pro mnoho organismů. Modrá biotechnologie bývá označována také jako vodní či mořská biotechnologie. Do oblasti modré biotechnologie patří růst mořských plodů, příprava průmyslových enzymů a dalších výrobků právě z mořských živočichů. Hlavní faktor, který hraje velkou roli při prodeji ryb a mořských plodů je jejich velikost, chuť, vůně ale i barva prodávajících mořských organismů, proto se hledají nové způsoby, jak docílit co nejlepších vlastností u ryb a mořských plodů. Využívá se hlavně rekombinantní genové technologie. Modrá biotechnologie je zatím nejméně rozvinutým odvětvím biotechnologie, avšak představuje velmi zajímavou a dynamickou oblast pro výzkum [1,3].

2.2 Bakterie

2.2.1 Stavba

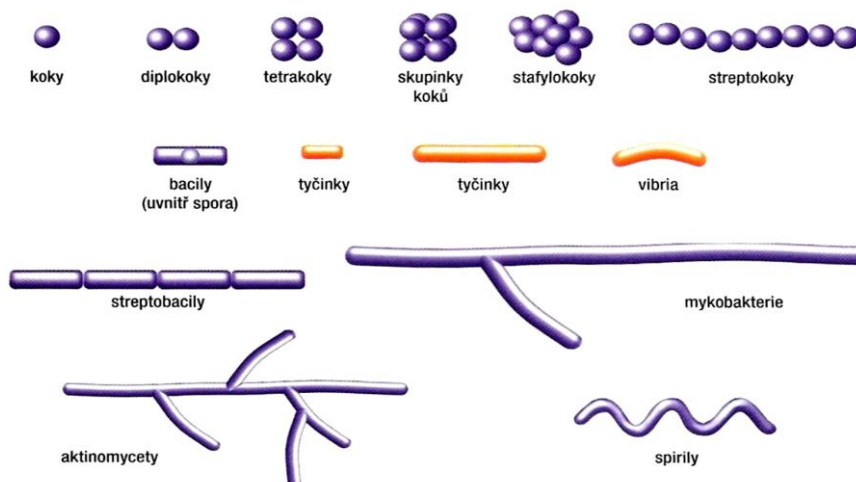
Bakterie jsou tvořeny jedinou buňkou prokaryotického typu. Bakteriální buňka nemá pravé jádro, ale v cytosolu je volně uložena jediná molekula DNA. Molekula DNA je uspořádána do kružnice a představuje jeden chromozóm, v němž je uložena genetická informace bakterie. Kružnicová molekula DNA je sbalena do malého útvaru, který je označován jako nukleoid. Molekula DNA má u bakterií tvar dvoušroubovice, je to tedy polynukleotid obsahující dvě purinové báze (adenin a guanin) a dvě pyrimidinové báze (thymin a cytosin). Cukr deoxyribosa je vázána prvním uhlíkem na purinovou nebo pyrimidinovou bázi, toto celé tvoří nukleosid. V cytosolu se vyskytují ribozomy, kde probíhá syntéza bílkovin. Na povrchu bakteriální buňky je cytoplazmatická membrána a buněčná stěna. Hlavní a základní složkou buněčné stěny bakterií je peptidoglykan (murein). Některé bakterie jsou navíc chráněné slizovým pouzdrém nebo obsahují bičík či fibrilii, díky nimž se mohou pohybovat [7, 8].



Obrázek 1 - Stavba bakteriální buňky [7]

2.2.2 Tvar bakterií

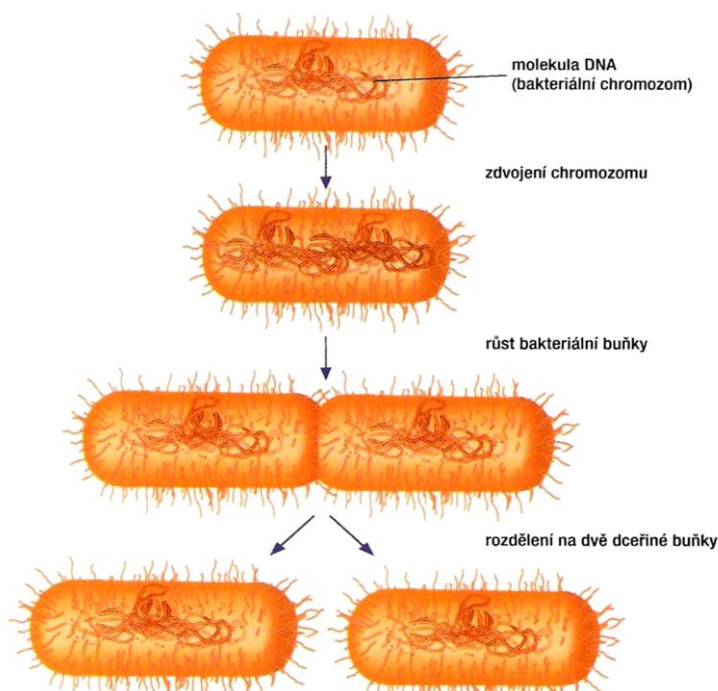
Bakteriální buňka může mít tvar kulovitý, označovaný jako koky, některé bakterie zůstávají po rozdělení spojeny a vytvářejí dvojice (diplokoky), řetízky (streptokoky) nebo hroznovité útvary (stafylokoky) (Obrázek 2). Bakterie tyčinkovitého tvaru se nazývají tyčinky a také mohou vytvářet dvojice nebo řetízky. Bacily jsou tyčinkovité bakterie, které mohou uvnitř obsahovat spory, což jsou kulovitá tělíska, která jsou odolná vůči nepříznivým vlivům okolí. Vibria jsou bakterie, které mají tvar zakřivené tyčinky. Dlouhé, několikrát zvlněné bakterie jsou označovány jako spirily. Šroubovitě stočené bakterie jsou spirochéty. Některé bakteriální buňky jsou podlouhlé a rozvětvené, buď částečně, to jsou mykobakterie, anebo úplně, aktinomycety [7].



Obrázek 2 - Tvar bakterií [7]

2.2.3 Rozmnožování

Většina bakterií se rozmnožuje dělením. Při dělení se prokaryotická buňka rozdělí ve dvě buňky dceřiné (Obrázek 3). Bakteriální chromozóm, který je tvořen jednou kružnicovou molekulou DNA, je připojen k cytoplazmatické membráně. Na počátku dělení dojde k duplikaci bakteriálního chromozomu a vzniku dvou identických kopií, které zůstávají připojeny k cytoplazmatické membráně. Bakteriální buňka začíná růst, tudíž se obě kopie chromozomů od sebe začínají vzdalovat. Když bakterie zvětší svoji velikost asi dvojnásobně, začne se plazmatická membrána dostávat dovnitř a rozdělí mateřskou buňku na dvě dceřiné. Každá dceřiná buňka obsahuje celou genetickou informaci. Bakterie se za příznivého prostředí rozmnožují velmi rychle. Schopnost bakterií mnohokrát se dělit a růst v krátkém čase jim umožňuje rychle se vyvíjet a získávat schopnost nových způsobů potravy nebo rezistenci proti působení antibiotik a jiných chemických látek [7, 8].



Obrázek 3 - Rozmnožování bakteriální buňky [7]

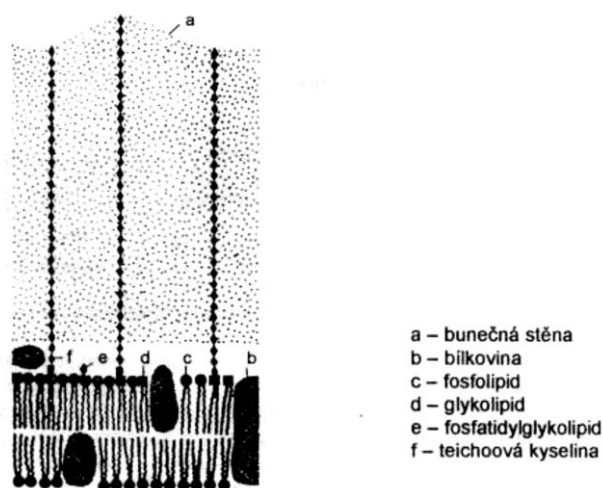
2.2.4 Složení buněčné stěny

Podle složení buněčné stěny bakterie dělíme na tři podříše – gramnegativní bakterie, grampozitivní bakterie a bakterie bez buněčné stěny. Každá skupina je charakterizována určitými fyziologickými a morfologickými znaky [9].

2.2.4.1 Grampozitivní bakterie

Grampozitivní bakterie stejně jako gramnegativní bakterií mají na povrchu cytoplazmy lipoproteinovou membránu [9].

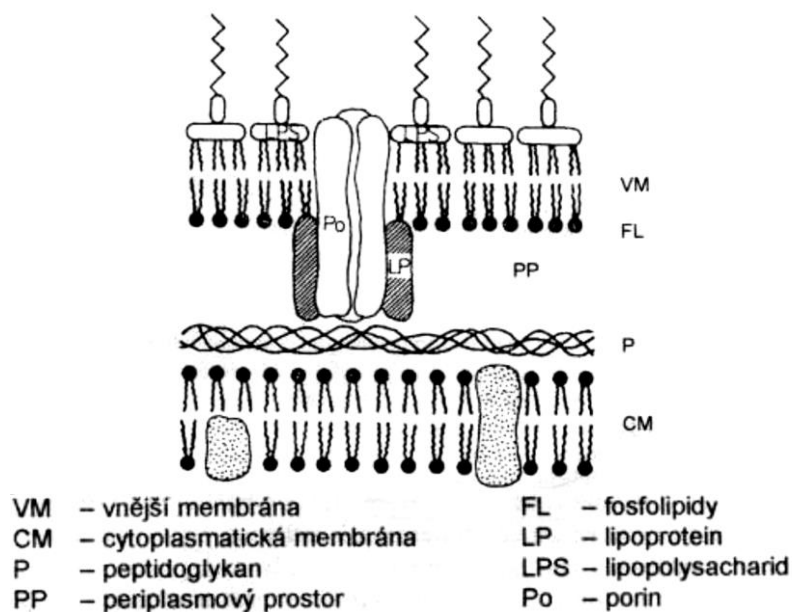
U grampozitivních bakterií je buněčná stěna asi 20 nm tlustá a tvořena mohutnou vrstvou peptidoglykanu, přes kterou na povrch pronikají lineární řetězce teichoových kyselin. Teichoové kyseliny jsou ve vodě nerozpustné lineární polymery glycerofosfátu nebo ribulofosfátu s glykosidicky navázanými cukry. Jsou vázány kovalentní vazbou k peptidoglykanu, ale nepodílejí se na pevnosti buněčné stěny. Teichoové kyseliny jsou hlavními povrchovými antigeny grampozitivních bakterií. Buněčná stěna grampozitivních bakterií neobsahuje lipidy ani bílkoviny, až na výjimky (např. mykobakterie, streptokoci...) [8,10].



Obrázek 4 – Buněčná stěna grampozitivní bakterie [10]

2.2.4.2 Gramnegativní bakterie

Stěna gramnegativních bakterií je jiná než stěna bakterií grampozitivních. Tato bakterie, oproti grampozitivní bakterii, je tenčí, menší, ale složením složitější. Gramnegativní bakterie je tvořena tenkou vrstvou peptidoglykanu, bez teichoové kyseliny, nad kterým je membrána tvořená dvojvrstvou fosfolipidů a bílkovinami vázanými po obou stranách této dvojvrstvy, nazývá se vnější membrána. Vnější vrstva membrány je tvořena lipopolysacharidem. Vnější membrána je poutána k peptidoglykanu molekulami lipoproteinu. Bílkovina je pak jedním koncem kovalentně vázána k peptidoglykanu a druhým lipofilním koncem tvořeným cysteinem je hydrofobní silou poutána do lipidové dvojvrstvy vnější membrány. Prostor mezi oběma membránami je označován jako periplazmatický prostor. Na povrchu se nacházejí liposacharidy. Buněčná stěna gramnegativních bakterií je mechanicky křehčí než stěna grampozitivních bakterií, ale zato chemicky odolnější [8, 10].



Obrázek 5 – Buněčná stěna gramnegativní bakterie [10]

2.2.5 Zdroj energie a uhlíku

Bakteriální buňka, stejně jako každý jiný živý organismus, je otevřený systém vyměňující s okolím hmotu, energii a informaci.

Podle způsobu získávání energie lze bakterie rozdělit do dvou skupin – bakterie fototrofní a chemotrofní. Fototrofie je svou podstatou zachycení energie světelného kvanta vhodnou molekulou a transformace této energie v energii excitovaného elektronu této molekuly. Chemotrofie je uvolňování energie obsažené v redukováných látkách jejich oxidací. Většina chemotrofních bakterií patří mezi chemoorganotrofní, protože předmětem oxidace jsou látky organické.

Podle zdroje uhlíku rozdělujeme bakterie na autotrofní a heterotrofní. Autotrofie je přijímání ze svého okolí jako zdroj uhlíku CO_2 a energii získanou buď oxidací anorganických látek, nebo ve formě světelné energie. Heterotrofie je přijímání ze svého okolí jako zdroj uhlíku organické látky a kyslík.

Dva způsoby získávání energie a dva způsoby zisku uhlíku jsou volně kombinovatelné, a proto máme celkem čtyři kategorie – fotoautotrofní (využívají světelnou energii k tvorbě organických látek z CO_2), fotoheterotrofní (mohou využívat světlo jako zdroj energie, ale uhlík musí získávat z organických zdrojů), chemoautotrofní (potřebují jako zdroj uhlíku CO_2 , ale místo světelné energie využívají energii získanou oxidací anorganických látek) a chemoheterotrofní (využívají organické látky jako zdroj uhlíku i jako zdroj energie) [10].

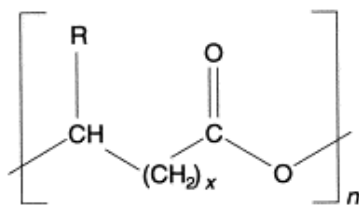
2.2.6 Využití bakterií

Mnoho poznatků z biochemie, genetiky či molekulární biologie pomohlo k všestrannému využití bakterií. V potravinářském průmyslu se využívají mléčné bakterie pro výrobu zakysaných mléčných produktů. Octové bakterie se využívají k výrobě octa. Schopnost bakterií využívat pro svou výživu různých zdrojů uhlíku umožňuje využít bakterie na čištění odpadních vod či rozklad pesticidů, které jsou v půdě. Bakterie se také využívají k produkci bílkovin, například hormonu, metodami genového inženýrství [7].

Jelikož jsou bakterie všudypřítomné, vyskytují se především v půdě, kde mají nezastupitelný význam. Některé rozkládají odumřelé zbytky a odpadní látky těl živočichů a rostlin na neústrojné, ve vodě rozpustné látky, které mohou být jako živiny přijímány kořeny vyšších rostlin. Tomuto rozkladu se říká mineralizace [11].

2.3 Polyhydroxyalkanoáty

Polyhydroxyalkanoáty (PHA) jsou polyestery syntetizovány a uloženy v bakteriálních buňkách ve formě intracelulárních granulí. Povrch granulí je tvořen vrstvou fosfolipidů a proteiny. Bakterie využívají polyhydroxyalkanoáty kvůli uhlíku, energii a snižování skladovací energie materiálů [12]. Skládají se z biopolymerů složených z monomerů (R)-3-hydroxy-mastných kyselin [13].



Obrázek 6 – Obecný vzorec polyhydroxyalkanoát [14]

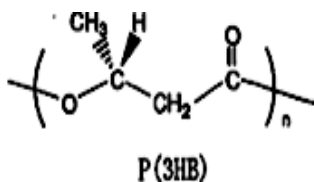
PHA jsou hydrofobní, ve vodě nerozpustné, inertní a na vzduchu po neomezenou dobu stabilní, jsou také termoplastické, elastomerní a netoxické. Nejdůležitější je, že tyto biopolymery jsou zcela biologicky rozložitelné. Obecně platí, že PHA mohou být rozděleny do dvou hlavních skupin, což jsou s krátkým řetězcem - PHA (scl-PHA), které obsahují monomerní jednotky s 3-5 atomy uhlíku, a se středně dlouhým řetězcem - PHA (mcl-PHA), které obsahují monomerní jednotky z 6-18 atomů uhlíku [15].

2.3.1 Typy PHA

Nejběžnější PHA jsou poly(3-hydroxybutyrát) P(3HB) a poly(3-hydroxybutyrát-co-3-hydroxyvalerát) P(3HB-co-3HV). Tyto materiály mají mechanické vlastnosti, které jsou srovnatelné s vlastnostmi polypropylenu a polyethylenu, i když mají mnohem nižší tažnost a jsou křehké [15].

2.3.1.1 Poly(R-3-hydroxybutyrát) P(3HB)

Neznámější a zároveň nejčastější biologický polyester produkovaný různými mikroorganismy v přírodě je P(3HB), který obsahuje opakující se jednotky (R)-3HB. Monomery polymerují do vysokomolekulárních polymerů v rozmezí od 200 000 do 3 000 000 Da, v závislosti na mikroorganismu a růstových podmínkách. P(3HB) má krystalovou strukturu, která byla stanovena pomocí rentgenových studií orientovaných vláken. Mechanické vlastnosti jako modulu pružnosti a pevností v tahu P(3HB) jsou velmi podobné vlastnostem polypropylenu, avšak opět ve srovnání s polypropylenem je P(3HB) poměrně tužší a křehčí [16].

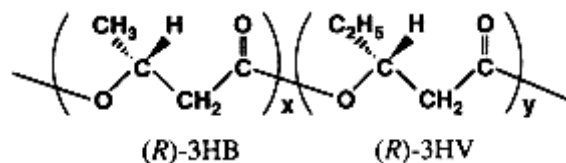


Obrázek 7 – Poly(3-hydroxybutyrát) [16]

2.3.1.2 Poly(3-hydroxybutyrát-co-3-hydroxyvalerát) P(3HB-co-3HV)

Díky začlenění 3-hydroxyvalerátu (3HV) jednotky do struktury PHA vzniká kopolymer poly(3-hydroxybutyrát-co-3-hydroxyvalerát), který má lepší mechanické vlastnosti a možnost zpracování [16].

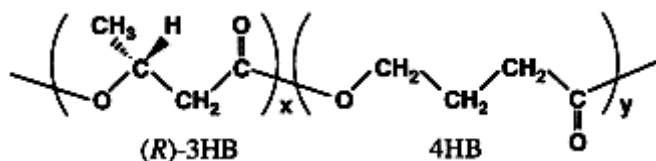
Konstrukční charakteristika P(3HB-co-3HV) je isodimorfismus, tj. cokrystalizace dvou monomerních jednotek v jedné z homopolymerových krystalových mřížek P(3HB) a P(3HV), v závislosti na tom, zda (R)-3HV složení je nad nebo pod ~40 mol % [16].



Obrázek 8 - Poly(3-hydroxybutyrát-co-3-hydroxyvalerát) [16]

2.3.1.3 Poly(3-hydroxybutyrát-co-4-hydroxybutyrát) P(3HB-co-4HB)

P(3HB-co-4HB) je biologicky odbouratelný a biokompatibilní kopolymer. Tento kopolymer může mít potenciální použití v řízeném uvolňování 4HB pro terapeutické účely [16].



Obrázek 9 - Poly(3-hydroxybutyrát-co-4-hydroxybutyrát) [16]

V Tabulka 1 - Fyzikální vlastnosti různých typů PHA s polypropylenem [17] jsou shrnuty a porovnány vlastnosti určitých typů polyhydroxyalkanoátů s polypropylenem.

Tabulka 1 - Fyzikální vlastnosti různých typů PHA s polypropylenem [17]

Fyzikální vlastnosti	P (3HB)	P (3HB-co-3HV) 90:10	P (3HB-co-3HV) 80:20	P (4HB)	P (3HB-co-4HB) 90:10	P (3HB-co-4HB) 10:90	PP
Teplota tání [°C]	179	150	135	53	159	50	170
Pevnost v tahu [MPa]	40	[20	104	24	65	34,5
Pružnost v tahu [GPa]	3,5	1,2	0,8	149	–	100	1,7
Roztažnost [%]	3,0	20	100	1000	242	1080	400

2.3.2 Využití PHA

V dnešní době jsou polyhydroxyalkanoáty využívány čím dál více [18]. Potenciál mají PHA především v náhradě velmi využívaných plastových obalových materiálů za biologicky rozložitelné obaly, které se mohou využívat jako nákupní tašky, kontejnery, hygienické výrobky, termoplasty. Polyhydroxyalkanoáty reprezentují třídu polymerů, která má obrovské uplatnění ve farmakologii a lékařství, především v oblasti bioimplantátů, kdy mohou být uplatňovány při výrobě náhradních kloubů či menisku, ve tkáňovém inženýrství se mohou využívat jako kožní náhrady, při hojení ran a stehů. V neposlední řadě mohou zastávat použití při výrobě systémů s postupným uvolňováním léčiv, jako jsou antibiotika nebo protinádorové léky [19, 20].

2.3.3 Bakterie produkující PHA

2.3.3.1 *Cupriavidus necator* H16

Cupriavidus necator H16 (dříve *Ralstonia eutropha* H16) je gram-negativní bakterie patřící mezi autolitotrofních mikroorganismy, nachází se v půdě a sladkovodních prostředích [21, 22]. *Cupriavidus necator* H16 produkuje ve svých granulích velkého množství poly(R-3-hydroxybutyrátu) a patří mezi nejvíce prostudované bakterie produkující PHA [21].

2.3.3.2 *Burkholderia cepacia*

Burkholderia cepacia je gram-negativní, aerobní bakterie. Vykazuje vysokou nutriční všestrannost a je odolná proti mnoha antibiotikům a dezinfekčním prostředkům. *B. cepacia* je členem skupiny známé jako *Burkholderia cepacia* komplex, kam společně s *Burkholderia cepacia* zahrnujeme 9 různých genomů. *Burkholderia cepacia* je také spojována s infekcí u pacientů s onemocněním plic, jako je například cystická fibróza a chronická granulomatózní onemocnění [23].

Burkholderia cepacia je schopna produkovat polyhydroxyalkanoáty a to především polyhydroxybutyrát, kopolymery polyhydroxybutyrátu a polyhydroxyvalerátu [23, 24].

2.3.3.3 *Burkholderia sacchari*

Burkholderia sacchari je gram-negativní bakterie se značným potenciálem pro průmyslovou výrobu bioplastů. Poprvé byla izolována v Brazílii z půdy cukrové třtiny. Bylo dokázáno, že dokáže se sacharózou, jako jediným zdrojem uhlíku, shromažďovat PHB až do 68 % buněčné sušiny. *Burkholderia sacchari* je schopna akumulovat po přidání prekursoru gama-butyrolaktonu (GBL) do média kopolymer P(3HB-co-4HB) [25, 26].

2.3.3.4 *Haloferax mediterranei*

Archeabakterie *Haloferax mediterranei* je extrémní halofil, patřící do třídy *Halobacteria*. *Haloferax mediterranei* roste rychleji než většina zástupců třídy *Halobacteria*. Je schopný růst i v prostředí o vysoké koncentraci soli, jako jsou moře nebo slaná jezera. Slouží jako dobrý model pro halobakteria při studii jejich fyziologie a metabolismu. *Haloferax mediterranei* je schopný produkce poly(3-hydroxybutyrát-co-3-hydroxyvalerátu) [27].

2.4 Kvasinky

2.4.1 Stavba

Kvasinky jsou heterotrofní eukaryotní mikroorganismy, patřící mezi houby. Vegetativní kvasinková buňka se skládá ze silné a pevné buněčné stěny, jemné cytoplazmatické membrány, cytoplazmy, která obsahuje spoustu membránových struktur, a jádra, které je od cytoplazmy odděleno dvojitou jadernou membránou. Pohybové orgány – bičíky, vegetativní kvasinky nemají. Některé rody kvasinek tvoří pohlavní spory, které ale mají odlišné vlastnosti než endospory bakterií [8].

2.4.2 Tvar kvasinek

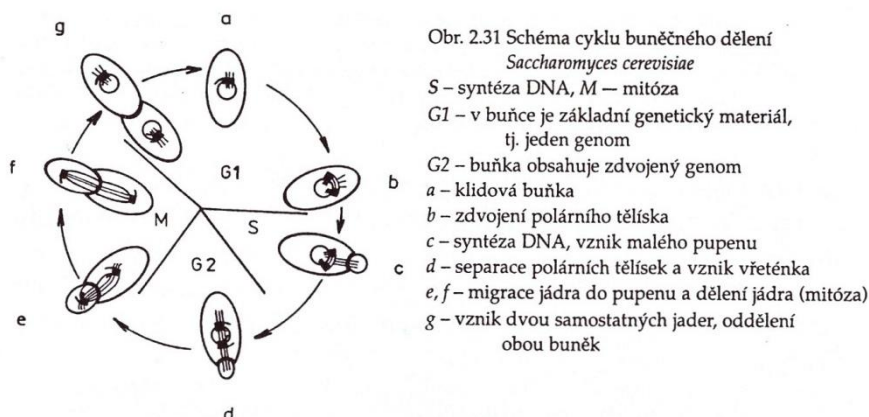
Kvasinky mají tvar nejčastěji elipsoidní, případně vějířovitý až kulovitý. Některé rody tvoří protáhlé buňky, vyskytují se i tvary jako citronovitý, trojúhelníkovitý a válcovitý. Tvar buněk i jejich velikost je do určité míry ovlivněna kultivačními podmínkami a stářím buňky. Velikost kvasinek se pohybuje v rozmezí 3-6 μm [8].

2.4.3 Rozmnožování

2.4.3.1 Vegetativní rozmnožování

Většina rodů kvasinek se vegetativně rozmnožuje pučením. Při pučení je vznikající dceřina buňka spojena kanálkem s mateřskou buňkou. Před pučením dochází ke splývání membrán endoplazmatického retikula a pak k jeho dělení, dále k opakovatelnému dělení vakuol a ke změně tvaru mitochondrie v dlouhé protáhlé. Po počátku tvorby dceřině buňky do ní vstupují drobné vakuoly a mitochondrie. Současně začne mitotické dělení jádra a jeho migrace k pupenu. S jádrem přecházejí do nově vytvořeného pupenu také další složky cytoplazmy. Pak se cytoplazmatickou membránou uzavře kanál mezi mateřskou a dceřinou buňkou a v dceřině buňce se syntetizuje a rozšiřuje endoplazmatické retikulum. Po vytvoření buněčné stěny mezi mateřskou a dceřinou buňkou, roste dceřiná buňka a spojení drobných vakuol ve vakuolu

jedinou je pučení dokončeno. Většinou se dceřiná buňka od mateřské oddělí ihned. Pokud zůstávají spojené i po několikátém dělení, vytvoří se tzv. buněčné svazky [8].

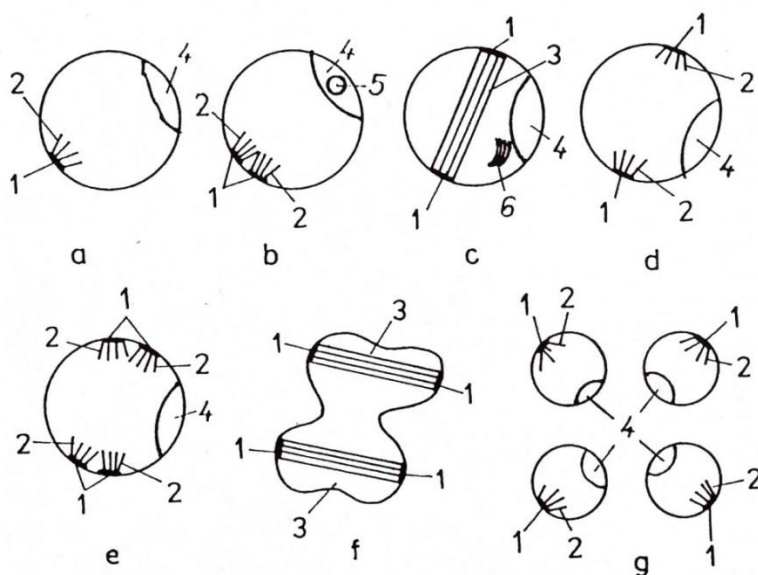


Obrázek 10 - Vegetativní rozmnožování kvasinek [8]

2.4.3.2 Pohlavní rozmnožování

U většiny kvasinek je vedle vegetativního rozmnožování známý pohlavní způsob rozmnožování. Výsledkem pohlavního rozmnožování jsou pohlavní spory. Většina kvasinek tvoří jako pohlavní spory askospory, což jsou endospory, umístěné ve vřetku (asku). Některé rody kvasinek ale tvoří pohlavní exospory, spory umístěné vně sporotvorných buněk.

Pohlavní rozmnožování je obecně charakterizováno spájením dvou haploidních buněk a spájením jejich jader za vzniku diploidního jádra. Pak se diploidní jádro dělí meiózou, to znamená redukčním dělením, ve čtyři haploidní jádra, která jsou buď základem pohlavních spor, nebo se dělí další mitózou a pak teprve vznikají spory. V životním cyklu kvasinek se tedy pravidelně střídá haploidní a diploidní fáze buněk [8].



Obr. 2.32 Jednotlivé fáze meiózy u *Saccharomyces cerevisiae*, pozorované v elektronovém mikroskopu
 a – diploidní jádro s jedním pólovým tělískem s mikrotubulami, b – rozdělení pólového tělíska, c – vytvoření vřeténka z pólových tělísek a mikrotubul, d – rozpad vřeténka, e – rozdělení obou pólových tělísek, f – vytvoření dvou vřetének, g – rozpad vřetének a vytvoření čtyř haploidních jader; 1 – pólové tělísko, 2 – mikrotubuly, 3 – vřeténko, 4 – jadérko, 5 – kulovité tělísko, 6 – polykomplexní tělísko

Obrázek 11 - Pohlavní rozmnožování kvasinek [8]

2.4.4 Využití kvasinek

Kvasinkovité organismy jsou v přírodě velmi rozšířené. Nejčastěji se vyskytují na materiálech s významným obsahem sacharidů (nejčastěji ovoce), ale i v květních nektarech, v půdě nebo ve střevním traktu lidí i zvířat. Za anaerobních podmínek, kdy chybí mikroorganismům, včetně kvasinek, pro oxidační fosforylaci kyslík, začnou podstupovat fermentaci. Fermentace zahrnuje dvě části, oxidační a redukční. Hlavním průmyslovým významem kvasinek je jejich použití v potravinářství, kde se využívají zejména při výrobě alkoholických nápojů a to především výroba piva, vína a pálenek, nebo v pekařském průmyslu a při výrobě krmného droždí [8].

Pekařské kvasinky mají vejčitý nebo krátký elipsoidní tvar. Pekařské droždí se připravuje aerobní fermentací okyselených melasových zápar s přidanými amonnými solemi a fosfátem. Kvasinky se rychle množí i v prostředí o nízkém množství cukru, přeměňují přirozené cukry obsažené v mouce na alkohol a oxid uhličitý, díky tomu těsto kyne [28, 29].

Kvasinka *Saccharomyces cerevisiae* se uplatňuje jako pekařská, lihovarská, vinařská nebo spodní či svrchní pivovarská kvasinka. Zkvašuje glukosu, sacharosu, maltosu, galaktosu a částečně nebo úplně také trisacharid rafinosu. Tento druh slouží také jako modelový mikroorganismus pro biochemické a genetické práce, a proto je nejprostudovanější kvasinkou [8].

2.4.4.1 Výroba piva

Pivovarské kvasinky mají převážně oválný až kulatý tvar. Pivovarské kvasinky lze rozdělit do dvou skupin, kvasinky svrchního kvašení *Saccharomyces cerevisiae* a kvasinky spodního kvašení *Saccharomyces uvarum* [28, 30, 31]. Při vaření piva nastává kvašení z cukrů obsažených v obilovinách. Každý pivovar má své specifické kmeny kvasinek a existují rozdíly ve vaření piva. Kvasinky spodního kvašení se využívají při vaření ležáků a plzeňských piv. Spodní kvašení probíhá při teplotách kolem 10 °C a kvašení probíhá 8-10 dnů. U svrchního kvašení se na povrchu kvasícího piva vytváří pěna způsobená unikajícím oxidem uhličitým, svrchní kvasnice jsou zadržovány ve shlukách. Svrchní kvašení probíhá při teplotách v rozmezí 15-20 °C po dobu 4-6 dní [30, 32].

2.4.4.2 Výroba vína

Vinařské kvasinky mají protáhlý elipsoidní tvar. [28] Prvním krokem při výrobě vína je rozdrcení sklizených hroznů. U bílého vína jsou rozdrcené hrozny lisovány a odděleny od stopek, slupky a jadýrek za zisku hroznového moštu. U červeného vína je tomu jinak, červené hrozny se fermentují, přičemž se odstraní pouze stonky, hlavním důvodem, proč se červené hrozny lisují i se slupkou je obsah červeného pigmentu (antokyanu) ve slupce hroznů, tento pigment je rozpustný pouze v alkoholu. V dalším kroku bývá často přidáván oxid siřičitý. Primární fermentace trvá asi 6 až 8 dní a iniciuje se přidáním kultivovaných kvasnic, které rozkládají cukr z hroznů na ethanol a oxid uhličitý. Aby se dosáhlo koncentrace 12 % alkoholu, je potřeba, aby mošt obsahoval kolem 24 % cukru, pokud tomu tak není, je do roztoku přidáván cukr. Jakmile je dokončena i sekundární fermentace, kvasinky se odstraní filtrací a vzniklé víno se přelije do sudů či tanků, kde zraje několik měsíců až let. [31] Během kvašení se vytváří i primární vedlejší produkty kvašení (glycerol, kyselina mléčná atd.) a sekundární vedlejší produkty kvašení (aceton, diacetyl, vyšší alkoholy atd.). [28, 32]

Prvořadou kvasinkou pro alkoholové kvašení vína je *Saccharomyces cerevisiae*, ale využíván bývá i příbuzný druh *Saccharomyces bayanus*. [32]

2.5 LUMiSizer

2.5.1 Analytická centrifugační odstředivka

LUMiSizer je temperovaná odstředivka umožňující fotometrické sledování změn koncentrace dispergovaných látek ve vzorku vlivem působení odstředivé síly. [33]

Tato analytická odstředivka je ideální pro charakterizaci a optimalizaci disperzních vlastností. Sedimentace dispergovaných částic se projeví jednak vyčerením části vzorku (zvýšení transmitance) a jednak tvorbou sedimentu (snížení transmitance). [34]

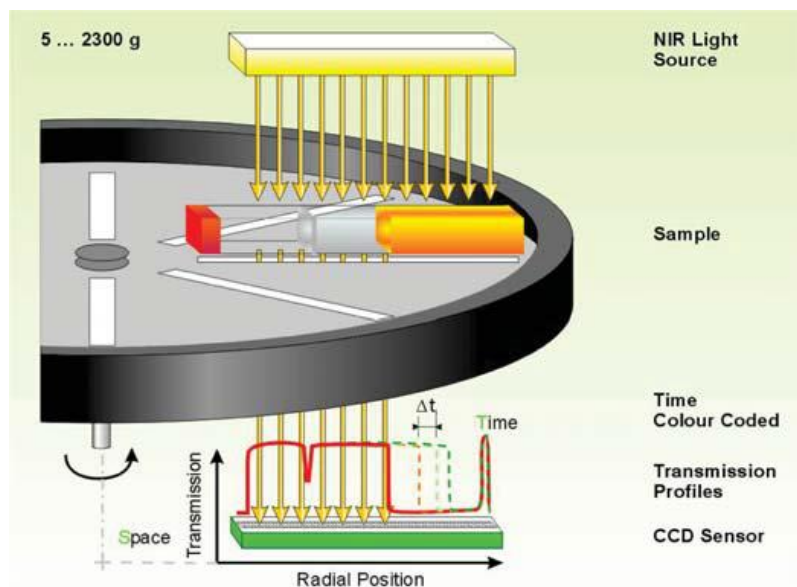


Obrázek 12 - LUMiSizer [34]

2.5.2 Princip měření LUMiSizeru

Analytická odstředivka je přístroj, kterým lze stanovit rychlost sedimentace v gravitačním poli, stabilitu připravené suspenze, reologické vlastnosti a velikost částic. Sedimentace dispergovaných částic se projeví jednak vyčerením části vzorku, tzn. zvýšením transmitance, a jednak tvorbou sedimentu, tzn. snížením transmitance. [35]

LUMiSizer pracuje na principu vyzařování infračerveného záření z blízké oblasti, které prochází kyvetou obsahující vzorek, neabsorbovaná část záření dále dopadá na detektor. Nakonec je zaznamenávána transmitance v závislosti na vzdálenosti od osy otáčení s časovým rozlišením. Soubor těchto transmitančních profilů je charakteristický pro daný disperzní systém a nese základní informace o jeho vlastnostech. [33, 35]



Obrázek 13 - Schématické zobrazení principu měření analytické odstředivky [35]

2.5.3 Průmyslová využitelnost

Moderní zařízení pro měření provádí komplexní kvalitativní a kvantitativní charakterizaci disperzí používajících se v celé řadě různých průmyslových a výzkumných pracovišť, která se zabývají mnoha materiály. S LUMiSizerem se můžeme setkat v kosmetickém průmyslu (krémy, výrobky pro péči o vlasy), ale i ve farmaceutickém průmyslu (zubní pasty, veterinární lékařství). Dalším využitím se stává potravinářský průmysl (dětská a kojenecká výživa, funkční potraviny, mléko a mléčné výrobky). Uplatnění nachází i v oblasti barev, laků či pigmentu (automobilové laky, tiskové barvy, pigmentové disperze). Je také důležitým pomocníkem při stanovování velikosti částic polymerů a latexů, kalů nebo technické disperze. [34]

3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

3.1 Použité chemikálie, mikroorganismy a přístroje

3.1.1 Použité mikroorganismy

V experimentální práci byly využívány bakterie *Cupriavidus necator* H16, *Burkholderia cepacia* a kvasinka *Saccharomyces cerevisiae* z České sbírky mikroorganismů Masarykovy univerzity v Brně a bakterie *Cupriavidus necator* PHB⁻⁴, *Burkholderia saccharia*, *Haloferax mediterranei* získaná z Liebnitz institutu, Německé sbírky mikroorganismů a buněčných kultur Braunschweig.

3.1.2 Chemikálie pro kultivaci

- Nutrient Broth 1 % pepton, HIMEDIA (India)
- Yeast Extract, HIMEDIA (India)
- Peptone, HIMEDIA a (India)
- Agar Powder, HIMEDIA (India)
- Glukosa, PENTA (ČR)

Ostatní použité chemikálie byly čistoty p.a. a byly získány od běžných dodavatelů.

3.1.3 Přístrojové vybavení

- Analytická centrifuga LUMiSizer, LUM GmbH (DE)
- Plynový chromatograf Traxe GC Ultra FID detector, kolona DB-WAX 30 m by 0,25mm, Finnigan (USA)
- Laminární box Aura mini, Bio Air Instruments (USA)
- Temperovaná třepačka Heidolph, Labicom s.r.o. (ČR)
- Analytické váhy Boeco (SRN)
- Termostat LS-35 (ČR)
- Centrifuga Sigma 1-14 (DE)
- Centrifuga Hettich EBA 20
- Vortex TK3S, Kartell spa (USA)
- Běžné laboratorní sklo a pomůcky

3.2 Kultivace mikroorganismů

3.2.1 Příprava inokula

K přípravě inokula pro bakterie *Cupriavidus necator* H16, *Cupriavidus necator* PHB⁻⁴, *Burkholderia cepacia*, *Burkholderia sacchari*, *Haloferax mediterranei* a kvasinku *Saccharomyces cerevisiae* bylo použito tekuté živné médium (viz kapitola 3.2.2). Připravené médium bylo sterilováno při teplotě 121 °C po dobu 20 minut.

Po dokončení sterilování a ochlazení média na pokojovou teplotu byly v laminárním sterilním boxu očkovány bakterie *Cupriavidus necator* H16, *Cupriavidus necator* PHB⁻⁴, *Burkholderia cepacia*, *Burkholderia sacchari*, *Haloferax mediterranei* a kvasinka *Saccharomyces cerevisiae* z agarové plotny pomocí kličky.

Následná kultivace probíhala 24 hodin při 30 °C pro *Cupriavidus necator* H16, *Cupriavidus necator* PHB⁻⁴, *Burkholderia cepacia*, *Burkholderia sacchari* a kvasinku *Saccharomyces cerevisiae*, pro bakterii *Haloferax mediterranei* byla nastavena teplota 37 °C.

3.2.2 Živné médium

Na přípravu inokula pro bakterii *Cupriavidus necator* H16, *Cupriavidus necator* PHB⁻⁴ a *Burkholderia cepacia* bylo použito komerčně dostupné tekuté živné médium Nutrient Broth o složení:

- Beef extract 10 g
- Pepton 10 g
- NaCl 5 g
- Agar 2 g
- Destilovaná voda 1 000 ml

Na přípravu inokula pro bakterii *Haloferax mediterranei* bylo připraveno následující kapalně médium, toto médium bylo rovněž použito jako produkční:

- NaCl 150 g
- CaCl₂·2 H₂O 0,69 g
- KCl 4 g
- NH₄Fe^{III} citrát 0,063 g
- SL6*** 1,25 g
- MgSO₄·7 H₂O 20,0 g
- NaHCO₃ 0,25 g
- NaBr 0,5 g
- Yeast extrakt 6,25 g
- Glukosa 30 g
- Destilovaná voda 1 000 ml

***SL6 - roztok stopových prvků

Na přípravu inokula pro bakterii *Burkholderia sacchari* bylo použité tekuté živné médium o složení:

- Yeast extract 0,5 g
- Protease peptone 0,5 g
- Casamino acids 0,5 g
- Škrob 0,5 g
- Pyruvát sodný 0,3 g
- KH₂PO₄ 0,3 g
- MgSO₄·7 H₂O 0,05 g
- Glukosa 10 g
- Destilovaná voda 1 000 ml

Na přípravu inokula pro kultivaci kvasinky *Saccharomyces cerevisiae* bylo používáno YPD médium:

- Yeast extrakt 10 g
- Peptone 20 g
- Glukosa 20 g
- Destilovaná voda 1 000 ml

3.2.3 Kultivace bakterií za účelem produkce PHA

Za účelem produkce PHA byla připravená inokula přeočkována do připravených minerálních médií. U bakterií *Cupriavidus necator* H16 a *Cupriavidus necator* PHB⁻⁴ bylo přeočkování prováděno i do tekutého média Nutrient Broth z důvodu porovnání vlastností mezi minerálním médiem a tekutým médiem Nutrient Broth.

Jako produkční médium pro bakterie *Cupriavidus necator* H16 a *Cupriavidus necator* PHB⁻⁴ bylo použito médium o následujícím složení:

- (NH₄)₂SO₄ 3 g
- KH₂PO₄ 1,02 g
- Na₂HPO₄·12 H₂O 11,1 g
- MgSO₄·7 H₂O 0,2 g
- Destilovaná voda 1 000 ml

Pro bakterie *Burkholderia cepacia* a *Burkholderia sacchari* bylo připraveno produkční médium o následujícím složení:

- (NH₄)₂SO₄ 0,75 g
- KH₂PO₄ 1,5 g
- Na₂HPO₄·15H₂O 9,082 g
- CaCl₂·2H₂O 0,1 g
- NH₄-Fe^{III} citrát 0,06 g
- MgSO₄·7H₂O 0,2 g
- Destilovaná voda 1 000 ml

Po dokončení sterilizace (121 °C/20 minut) byl v laminárním boxu přidán roztok stopových prvků MES*, inokulum *Cupriavidus necator* H16 nebo *Cupriavidus necator* PHB⁻⁴ a roztok fruktosy.

U přípravy produkčních médií bylo postupováno stejně jako při přípravě minerálních médií, pouze se místo fruktosy přidala glukosa a místo roztoku MES* byl použit roztok TES**. Takto připravená produkční média byla používána pro kultivaci bakterií *Burkholderia cepacia* a *Burkholderia sacchari*.

U bakterie *Haloferax mediterranei* bylo použito produkční médium stejným způsobem jako inokulum, glukosa a SL6*** (stopové prvky) bylo přidání až po sterilaci.

Připravené kultury byly po dobu 16-88 hodin kultivovány na třepačce při teplotě 30 °C, pouze kultura s bakterií *Haloferax mediterranei* byla kultivována při teplotě 37 °C.

* Složení roztoku stopových prvků MES:

- FeCl₃ 9,7 g
- CaCl₂ 7,8 g
- CuSO₄ 0,156 g
- CoCl₂ 0,119 g
- NiCl₂ 0,118 g
- CrCl₂ 0,062 g
- 0,01 M HCl 1 000 ml

** Složení roztoku stopových prvků TES:

- ZnSO₄ 0,1 g
- MnCl₂ 0,03 g
- H₃BO₃ 0,3 g
- CoCl₂ 0,02 g
- NiCl₂ 0,02 g
- Na₂MoO₄ 0,03 g
- Destilovaná voda 1 000 ml

*** Složení roztoku stopových prvků SL6:

ZnSO ₄ ·7 H ₂ O	0,10 g
MnCl ₂ ·4 H ₂ O	0,03 g
H ₃ BO ₃	0,30 g
CoCl ₂ ·6 H ₂ O	0,20 g
CuCl ₂ ·2 H ₂ O	0,01 g
NiCl ₂ ·6 H ₂ O	0,02 g
Na ₂ MoO ₄ ·2 H ₂ O	0,03 g
Destilovaná voda	1 000 ml

3.2.4 Kultivace kvasinky *Saccharomyces cerevisiae*

U kvasinky *Saccharomyces cerevisiae* se vytvořilo nové YPD médium a produkční minerální médium.

Do Erlenmeyerových baněk o objemu 100 ml bylo připraveno 50 ml YPD média, stejným způsobem, jako při přípravě inokula. Po sterilizaci a ochlazení roztoku, bylo do média přidáno 5 ml inokula *Saccharomyces cerevisiae*.

Jako produkční medium kvasinku *Saccharomyces cerevisiae* bylo používáno v Erlenmeyerových baňkách o objemu 100 ml s 50 ml následujícího minerálního média:

- Kvasniční extrakt 4 g
- (NH₄)₂SO₄ 1 g
- MgSO₄·7H₂O 0,5 g
- KH₂PO₄ 1 g
- Glukosa 100 g
- Destilovaná voda 1 000 g

Po sterilizaci (121 °C/20 minut) bylo v laminárním boxu přidáno inokulum *Saccharomyces cerevisiae*. Připravené kultury byly po dobu 42-76 hodin kultivovány na třepačce při teplotě 30 °C.

3.3 Stanovení biomasy

Obsah biomasy byl stanovován dvěma způsoby, gravimetrickou a spektrofotometrickou metodou založenou na měření zákalu.

3.3.1 Gravimetrické stanovení biomasy

Po ukončení kultivace bylo odebráno 5 ml vzorku do předem zvážených zkumavek. Vzorky byly centrifugovány při 6 000 ot/min po dobu 5 min. Supernatan byl slit a k sedimentu bylo přidání 5 ml destilované vody, u bakterie *Haloferax mediterranei* bylo přidáno 5 ml roztoku NaCl. Směs byla rozsuspendována a poté se znovu centrifugovala při 6 000 ot/min po dobu 5 min. Vzniklý supernatan byl opět slit a získaná biomasa byla vysušena při 75 °C do konstantní hmotnosti. Po úplném vysušení bylo pomocí analytických vah stanoveno množství biomasy.

3.3.2 Spektrofotometrické stanovení biomasy

Po ukončení kultivace byl vždy z každé připravené kultivace 3x odebrán vzorek. Kultury bylo nutné před samotným měřením přímo v kyvetě zředit tak, aby změřená absorbance vždy ležela v optimálním rozmezí hodnot. Absorbance byla měřena při vlnové délce 630 nm. Jako blank byla ve všech případech použita destilovaná voda, pouze u bakterie *Haloferax mediterranei* byl jako blank použit roztok NaCl, tuto bakterií bylo nutné naředit opět roztokem NaCl. Obsah biomasy byl poté stanoven na základě regresní rovnice kalibrační přímky.

3.4 Stanovení PHA pomocí plynové chromatografie s FID

3.4.1 Stanovení kalibrační přímky

Kalibrační přímka byla sestavena z P(3HB-co-3HV), obsahující 88 % 3HB a 12 % HV. Standardní roztok byl napipetován do vialek o objemu 0,05; 0,2; 0,4; 0,6; 0,8 a 1 ml a doplněny chloroformem na celkový objem 1 ml. K roztokům bylo přidáno 0,8 ml 15 % kyseliny sírové v methanolu a vialky byly umístěny do termostatu na 3 hodiny při teplotě 94 °C. Po ukončení esterifikace byl celkový objem smíchán s 0,5 ml NaOH o koncentraci 0,05 mol/dm³. Po protřepání a následnému oddělení fází bylo ze spodní fáze odpipetováno 0,05 ml do čistých vialek a přidáno 0,95 ml chloroformu na doplnění objemu na 1 ml. Vialky byly uzavřeny a jednotlivé standardy analyzovány pomocí plynové chromatografie s FID detektorem.

3.4.2 Příprava vzorků pro plynovou chromatografii

Zároveň se stanovováním biomasy byl stanovován obsah polyhydroxyalkanoátů. Do vialek bylo odebráno vždy přibližně 10 mg vysušené biomasy (viz kapitola 3.3.1), byl přidán 1 ml chloroformu a 0,8 ml 15 % kyseliny sírové v methanolu. Vialky byly řádně zavíčkované a směs byla udržována po dobu 3 hodin v termostatu při teplotě 94 °C. Po esterifikaci byla směs extrahována v 0,5 ml roztoku NaOH o koncentraci 0,05 mol/dm³. Po oddělení vrstev bylo do nově připravených vialek odpipetováno 0,05 ml roztoku ze spodní fáze (chloroformové) a přidáno 0,95 ml chloroformu. Vialky byly uzavřeny a vzorky byly analyzovány pomocí plynové chromatografie s FID detektorem.

3.5 Stanovení sedimentačního potenciálu

3.5.1 Příprava vzorků

Z kultur bakteriálních kmenů *Cupriavidus necator* H16, *Cupriavidus necator* PHB⁻⁴, *Burkholderia cepacia*, *Burkholderia sacchari*, *Haloferax mediterranei* a kvasinky *Saccharomyces cerevisiae* v příslušných médiích bylo do speciálních 2 mm kyvet z materiálu PC nebo PA odebráno přibližně 2 mm vzorku. Roztoky byly centrifugovány při temperované teplotě 25 °C, při 2 000 ot/min s krokem měření po 10 s po dobu 30-60 min. U kvasinky *Saccharomyces cerevisiae* bylo nutné snížit počet otáček za minutu z důvodu rychlejší sedimentace, a proto měření probíhalo pouze při 200 ot/min.

3.5.2 Působení vody na bakterii *Haloferax mediterranei*

K halofilní bakterii *Haloferax mediterranei* byla přidávána destilovaná voda v poměru k bakterii 1:1, 1:2, 2:1 a bez přidání vody (viz Tabulka 2 - Složení roztoků).

Pomocí analytické odstředivky LUMiSizer byla u vzorků analyzována rychlost sedimentace a index nestability.

Tabulka 2 - Složení roztoků

Vzorek	V _{H. mediterranei} [ml]	V _{voda} [ml]
1a	2,5	2,5
1b	2,5	2,5
2a	4,0	2,0
2b	4,0	2,0
3a	2,0	4,0
3b	2,0	4,0
4a	4,0	0
4b	4,0	0

3.5.3 Sledování růstu bakterií

U bakterií *Cupriavidus necator* H16, *Cupriavidus necator* PHB⁻⁴, *Burkholderia cepacia*, *Burkholderia sacchari* a *Haloferax mediterranei* byl sledován růst daných kultur. První odběr vzorku kmene *Haloferax mediterranei* byl po 16 hodinách kultivace, u ostatních bakterií, tedy u *Cupriavidus necator* H16, *Cupriavidus necator* PHB⁻⁴, *Burkholderia cepacia* a *Burkholderia sacchari* byl první odběr uskutečněný po 24 hodinách. Další odběry probíhaly přibližně po 12 hodinách.

Kultivace bakterie *Haloferax mediterranei* byla ukončena po 88 hodinách, u ostatních sledovaných bakterií, *Cupriavidus necator* H16, *Cupriavidus necator* PHB⁻⁴, *Burkholderia cepacia*, *Burkholderia sacchari*, byl růst ukončen po 73 hodinách.

Pomocí analytické odstředivky LUMiSizer byla u vzorků analyzována rychlost sedimentace a index nestability.

3.5.4 Působení stresových faktorů na bakterie

Na připravené suspenze buněk bylo působeno stresovými faktory – teplotním a solným stresem.

3.5.4.1 Působení teplotního stresu na bakterie

Stresu byly vystavovány bakterie produkující PHA, takže *Cupriavidus necator* H16, *Burkholderia cepacia*, *Burkholderia sacchari* a *Haloferax mediterranei* a také mutantní kmen, bakterie *Cupriavidus necator* PHB⁻⁴ (neprodukující PHA). Kmeny byly kultivovány ve specifických médiích pro dané kmeny (viz kapitola 3.2.3). Při experimentu byly jednotlivé 2 ml vzorky stresovány po dobu 15 minut ve vodní lázni vyhřáté na předem zvolenou teplotu, a to 60 °C, 70 °C, 80 °C a 90 °C.

Pomocí analytické odstředivky LUMiSizer byla u vzorků analyzována rychlost sedimentace a index nestability.

3.5.4.2 Působení stresu mrazem na bakterie

Při stresu mrazem byly použity bakterie produkující PHA, *Cupriavidus necator* H16, *Burkholderia cepacia*, *Burkholderia sacchari* a *Haloferax mediterranei* a také mutantní kmen, bakterie *Cupriavidus necator* PHB⁻⁴, neprodukující PHA. Kmeny byly kultivovány ve specifických médiích pro dané kmeny (viz kapitola 3.2.3). Vzorky byly odebrány po 2 ml a umístěny do mrazáku, kde byly uchovány při teplotě -30 °C po dobu 1, 2, 4 hodin.

Před měřením na analytické odstředivce LUMiSizer byly vzorky rozpuštěny při pokojové teplotě a poté byla u vzorků analyzována rychlost sedimentace a index nestability.

3.5.4.3 Působení solného stresu na bakterie

K solnému stresu byly použity bakterie produkující PHA, takže *Cupriavidus necator* H16, *Burkholderia cepacia*, *Burkholderia sacchari* a *Haloferax mediterranei* a také mutantní kmen, bakterie *Cupriavidus necator* PHB⁻⁴, neprodukující PHA. Kmeny byly kultivovány ve specifických médiích pro dané kmeny (viz kapitola 3.2.3). Vzorky byly po dobu 4 hodin při inkubaci 30 °C vystaveny solnému stresu, kdy se přidával roztok NaCl o koncentraci 50, 100, 150 a 200 g/l.

Pomocí analytické odstředivky LUMiSizer byla u vzorků analyzována rychlost sedimentace a index nestability.

3.5.5 Vliv složení média na centrifugaci PHA produkujících bakterií

Bakterie *Cupriavidus necator* H16 a *Cupriavidus necator* PHB⁻⁴ byly kultivovány v minerálním médiu a v komplexním médiu Nutrient Broth (viz kapitola 3.2.3). Experiment byl prováděn po 42 a 72 hodinách.

Pomocí analytické odstředivky LUMiSizer byla u vzorků analyzována rychlost sedimentace a index nestability.

3.5.6 Sledování růstu kvasinky *Saccharomyces cerevisiae* v různých médiích

Kvasinka *Saccharomyces cerevisiae* byla kultivována v produkčním médiu a v YPD médiu (viz kapitola 3.2.4). Po 42, 54, 72 a 76 hodinách probíhal odběr vzorku. Pomocí analytické centrifugy LUMiSizer byla u vzorků analyzována rychlost sedimentace a index nestability.

4 VÝSLEDKY A DISKUZE

4.1 Působení vody na bakterii *Haloferax mediterranei*

U bakterie *Haloferax mediterranei* byl nejprve stanoven obsah biomasy gravimetrickou a spektrofotometrickou metodou. Tato bakterie je extrémně halofilní, ke svému růstu potřebuje prostředí o vysoké koncentraci soli (viz kapitola 2.3.3.4). V přítomnosti prostředí o nižší osmotické síle dochází vlivem rozdílu osmotického tlaku mezi buňkou a vnějším prostředím k narušení buněčné stěny a uvolnění intracelulárních granulí PHA do prostředí mimo buňku. Principem tohoto experimentu bylo vystavení bakterie *Haloferax mediterranei* prostředí o různé osmotické síle a studium vlivu různé osmotické síly na rychlost sedimentace. Bakterie *Haloferax mediterranei* byla před samotným měřením na analytické centrifuze smíchána v různých poměrech vody (viz Tabulka 2 - Složení roztoků). Pomocí analytické centrifugy byl stanovován index nestability, tedy v jakém z analyzovaných prostředí je bakterie *Haloferax mediterranei* nejstabilnější. Dále pak byla stanovena rychlost sedimentace a určen vzorek, který sedimentoval nejrychleji, popřípadě nejpomaleji.

4.1.1 Kalibrace metod

4.1.1.1 Stanovení obsahu biomasy

Gravimetrické stanovení obsahu biomasy bakteriální kultury bylo stanovováno ve dvou paralelních pokusech.

Tabulka 3 - Gravimetrické stanovení obsahu biomasy

Producent PHA	c_1 [g/l]	c_2 [g/l]	\bar{c} [g/l]	smodch
<i>Haloferax mediterranei</i>	16,74	17,68	17,21	0,66

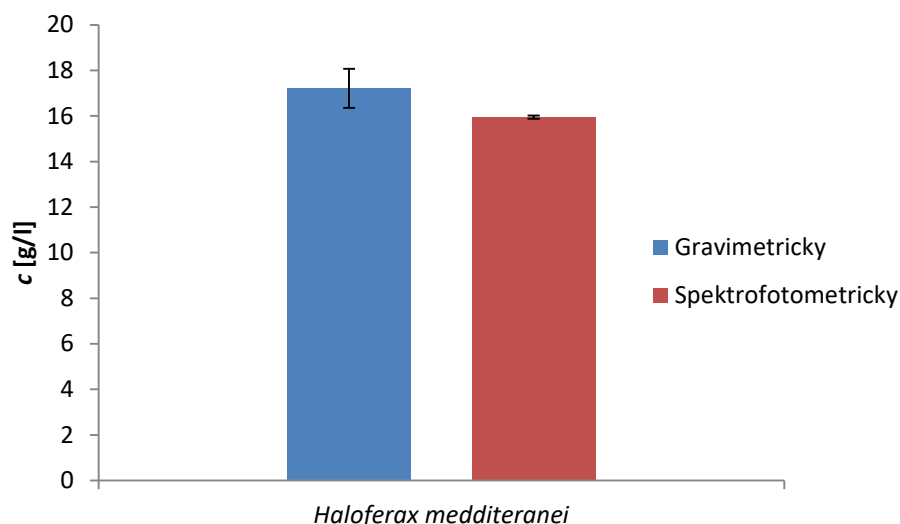
Gravimetrickou metodou byl stanoven obsah biomasy po 72 hodinách kultivace u bakterie *Haloferax mediterranei* na 17,21 g/l.

Při spektrofotometrickém stanovování obsahu biomasy bylo nutné před samotným měřením zákalu vzorek naředit, aby hodnota absorbance byla v odpovídajícím rozmezí kalibrační přímky. Absorbance byla měřena při vlnové délce 630 nm, jako blank byl použit roztok NaCl (150 g/l). Hodnoty koncentrace biomasy byly vypočítány pomocí kalibrační přímky $y = 3,9376 \cdot x$.

Tabulka 4- Spektrofotometrické stanovení obsahu biomasy

Producent PHA	\bar{A}	c [g/l]	smodch
<i>Haloferax mediterranei</i>	0,628	15,95	0,07

Spektrofotometrickou metodou měřením zákalu bylo množství biomasy po 72 hodinách kultivace u bakterie *Haloferax mediterranei* stanoveno na 15,95 g/l.



Obrázek 14 - Porovnání gravimetrického a spektrofotometrického stanovení obsahu biomasy u bakterie *Haloferax mediterranei*

Mezi hodnotami stanovení obsahu biomasy gravimetrickou a spektrofotometrickou metodou byly odchylky, avšak u bakterie *Haloferax mediterranei* bych jako přesnější metodu na stanovení obsahu biomasy upřednostnila spektrofotometrické stanovení. Rozdíl je možné vysvětlit přítomností soli, která zůstala ve zbytku biomasy, tudíž nebyla dostatečně promyta destilovanou vodou. Zbytková sůl v biomase může ovlivňovat výsledky při gravimetrické metodě.

4.1.2 Stanovení rychlosti sedimentace

Pomocí analytické centrifugy byla stanovována rychlost sedimentace u bakterie *Haloferax mediterranei*. Před samotným měřením byly připraveny roztoky o různé osmotické síle (viz Tabulka 2 - Složení roztoků). Rychlost sedimentace byla vyhodnocována v čase 400 s při transmitanci 50 % a relativní centrifugační síle 510 g. Vzorky byly vždy stanovovány ve dvou paralelních pokusech.

Měření sedimentační rychlosti je citlivé na hmotnost a tvar analyzovaných částic. Při použití dostatečně velké odstředivé síly za vysokých otáček se začnou všechny částice stejnoměrně pohybovat směrem ke dnu kyvety. Doba, za kterou částice dosedimentují na dno kyvety je vyjádřena jako rychlost sedimentace. Relativní centrifugační síla vyjadřuje poměr mezi centrifugačním zrychlením a zrychlením tíhovým, udává tedy, kolikrát je vyvolané centrifugační zrychlení vyšší než tíhové zrychlení, udává se v násobcích g. [36, 38]. Transmitance udává, kolik světla prošlo vzorkem při analýze analytickou centrifugou.

Tabulka 5 - Hodnoty rychlosti sedimentace v čase 400 s při transmitanci 50 % a relativní centrifugační síle 510 g

Vzorek		Rychlost sedimentace [μm/s]	Průměrná rychlost sedimentace [μm/s]	smodch
1a	HM : voda = 1 : 1	31,89	32,33	0,615
1b	HM : voda = 1 : 1	32,76		
2a	HM : voda = 2 : 1	22,22	23,07	1,202
2b	HM : voda = 2 : 1	23,92		
3a	HM : voda = 1 : 2	50,21	51,17	1,351
3b	HM : voda = 1 : 2	52,12		
4a	HM	13,22	12,30	1,308
4b	HM	11,37		

Pozn.: HM – *Haloferax mediterranei*

Z naměřených dat je zřejmé, že nejpomaleji sedimentoval vzorek 4a a 4b, čisté kultury bakterie *Haloferax mediterranei* bez přidání vody, přičemž průměrná hodnota rychlosti sedimentace činila 12,30 μm/s. Nejrychleji sedimentoval vzorek 3a a 3b, kde bylo největší zastoupení vody – nejnižší osmotická síla, poměr vody k bakterii *Haloferax mediterranei* byl tedy 2:1, průměrná hodnota rychlosti sedimentace tak byla stanovena na 51,17 μm/s.

Je patrné, že čím bylo přidáno většího množství vody, tím rychleji měřené vzorky sedimentovaly. Rychlost sedimentace zde byla až pětikrát vyšší oproti čisté kultuře bakterie *Haloferax mediterranei*. Bylo avšak nutné užít hodnotu transmitance 50 %, což je vyšší transmitance než je doporučená hodnota, přibližně 25 %. Vyšší hodnotu transmitance bylo nutné užít především z důvodu, že studovaná kultura *Haloferax mediterranei* nevykazuje takovou zakalenost vzorku.

4.1.3 Stanovení indexu nestability

Pomocí analytické centrifugy byl stanoven index nestability u bakterie *Haloferax mediterranei*. Před samotným měřením byly připraveny roztoky vody a bakterie smíchané v různých poměrech (viz Tabulka 2 - Složení roztoků). Index nestability byl vyhodnocován v čase 400 s při relativní centrifugační síle 530 g. Vzorky byly vždy stanovovány ve dvou paralelních pokusech.

Pomocí indexu nestability tak můžeme určit, jaký z analyzovaných systémů je nejstabilnější a naopak [37].

Tabulka 6 - Hodnoty indexu nestability v čase 400 s při relativní centrifugační síle 530 g

	Vzorek	Index nestability	Průměrná hodnota indexu nestability	smodch
1a	HM : voda = 1 : 1	0,551	0,566	0,021
1b	HM : voda = 1 : 1	0,581		
2a	HM : voda = 2 : 1	0,417	0,447	0,042
2b	HM : voda = 2 : 1	0,476		
3a	HM : voda = 1 : 2	0,686	0,695	0,012
3b	HM : voda = 1 : 2	0,703		
4a	HM	0,280	0,267	0,019
4b	HM	0,253		

Pozn.: HM – *Haloferax mediterranei*

Z naměřených dat je patrné, že nejvíce nestabilní se projevil vzorek 3a a 3b, kde byla voda v nadbytku, tedy bakterie *Haloferax mediterranei* byla v poměru k vodě 1:2, hodnota indexu nestability byla stanovena na průměrnou hodnotu 0,695. Nejvíce stabilní byl vzorek 4a a 4b, který obsahoval pouze bakterii *Haloferax mediterranei* bez přidání vody, průměrná hodnota indexu nestability byla stanovena na 0,267.

Je patrný trend, že čím bylo přidáno většího množství vody, tím se vzorky stávaly více nestabilními, téměř třikrát v porovnání s čistou kulturou bakterie *Haloferax mediterranei*. Je to způsobeno tím, že snížením osmotické síly prostředí dojde k narušení buněčných stěn bakterie *Haloferax mediterranei*, buňky popraskají, tento děj má vliv na stability vzorku, tedy čím vyšší je osmotická síla prostředí, tím je suspenze buněk stabilnější. Byl potvrzen trend z předchozího měření (viz Stanovení rychlosti sedimentace).

4.2 Sledování růstu bakterií

U bakterií *Cupriavidus necator* H16, *Cupriavidus necator* PHB⁻⁴, *Burkholderia cepacia*, *Burkholderia sacchari* byl sledován růst po dobu 24 – 73 hodin, u bakterie *Haloferax mediterranei* byl sledován růst po dobu 16 – 88 hodin, doba kultivace jednotlivých analyzovaných bakterií je uvedena v kapitole 4.2.1.1, během kultivace výše zmíněných bakterií byly v pravidelných intervalech odebírány vzorky, u kterých byla stanovena koncentrace biomasy a polyhydroxyalkanoátů, vzorky byly také proměřeny na analytické centrifuze, kdy byla měřena rychlost sedimentace a určen vzorek, který sedimentoval nejrychleji, popřípadě nejpomaleji. Stanovován byl i index nestability u analyzovaných vzorků, tedy kdy byla určitá bakterie nejstabilnější.

4.2.1 Kalibrace metod

4.2.1.1 Stanovení obsahu biomasy

Gravimetrické stanovení obsahu biomasy bakteriální kultury bylo stanovováno ve dvou paralelních pokusech.

Tabulka 7 - Gravimetrické stanovení biomasy bakterie *Burkholderia sacchari*

doba kultivace [hod]	c_1 [g/l]	c_2 [g/l]	\bar{c} [g/l]	smodch
24	1,42	1,60	1,51	0,13
30	1,68	1,44	1,56	0,17
49	2,24	2,02	2,13	0,16
55	2,72	3,12	2,92	0,28
73	3,44	3,12	3,28	0,23

Tabulka 8 - Gravimetrické stanovení obsahu biomasy bakterie *Burkholderia cepacia*

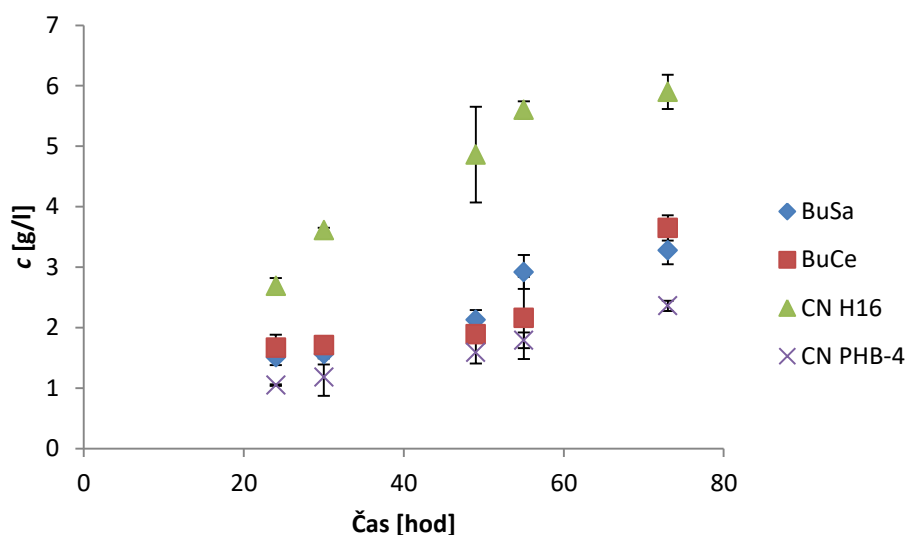
doba kultivace [hod]	c_1 [g/l]	c_2 [g/l]	\bar{c} [g/l]	smodch
24	1,82	1,52	1,67	0,21
30	1,68	1,74	1,71	0,04
49	1,88	1,90	1,89	0,01
55	2,64	1,68	2,16	0,68
73	3,50	3,80	3,65	0,21

Tabulka 9 - Gravimetrické stanovení obsahu biomasy bakterie *Cupriavidus necator* H16

doba kultivace [hod]	c_1 [g/l]	c_2 [g/l]	\bar{c} [g/l]	smodch
24	2,78	2,60	2,69	0,13
30	3,64	3,58	3,61	0,04
49	5,42	4,30	4,86	0,79
55	5,50	5,70	5,60	0,14
73	6,10	5,70	5,90	0,28

Tabulka 10 - Gravimetrické stanovení obsahu biomasy bakterie *Cupriavidus necator* PHB⁻⁴

doba kultivace [hod]	c_1 [g/l]	c_2 [g/l]	\bar{c} [g/l]	smodch
24	1,06	1,04	1,05	0,01
30	0,96	1,40	1,18	0,31
49	1,46	1,72	1,59	0,18
55	1,88	1,70	1,79	0,13
73	2,42	2,30	2,36	0,08



Obrázek 15 - Gravimetrické stanovení obsahu biomasy

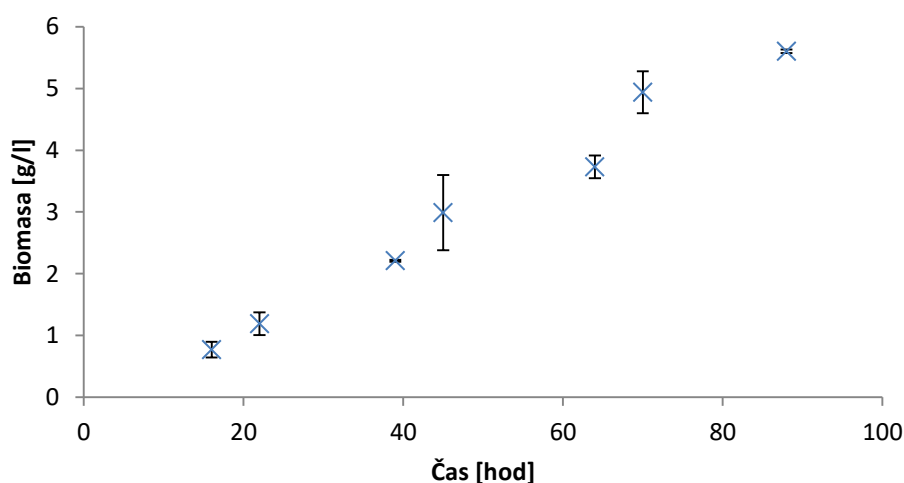
Gravimetrickou metodou byl stanoven obsah biomasy u bakterií *Cupriavidus necator* H16, *Cupriavidus necator* PHB⁻⁴, *Burkholderia cepacia* a *Burkholderia sacchari*. Nejrychlejší růst buněk byl pozorován u bakterie *Cupriavidus necator* H16. U ostatních z výše zmiňovaných bakterií byl růst velice podobný, koncentrace buněk u bakterií *Burkholderia cepacia* a *Burkholderia sacchari* dosahovaly podobných hodnot. Nejnížší výtěžky biomasy byly zjištěny u bakterie *Cupriavidus necator* PHB⁻⁴.

Spektrofotometrické stanovení obsahu biomasy bylo v tomto experimentu stanoveno pouze u bakterie *Haloferax mediterranei* z důvodu možné interferující přítomnosti soli. Před samotným měřením zákalu bylo nutné vzorek naředit, aby hodnota absorbance byla v odpovídajícím rozmezí kalibrační přímky. Absorbance byla měřena při vlnové délce 630 nm, jako blank byl použit roztok NaCl (150 g/l). Hodnoty koncentrace biomasy byly vypočítány pomocí kalibrační přímky $y = 3,9376 \cdot x$.

Tabulka 11 - Spektrofotometrické stanovení obsahu biomasy bakterie *Haloferax mediterranei*

doba kultivace [hod]	$\emptyset A$	c [g/l]	smodch
16	0,188	0,48	0,03
22	0,353	0,90	0,02
39	0,735	1,87	0,09
45	0,955	2,43	0,05
64	0,277	3,52	0,29
70	0,354	4,50	0,37
88	0,401	5,10	0,01

Haloferax mediterranei



Obrázek 16 - Spektrofotometrické stanovení obsahu biomasy

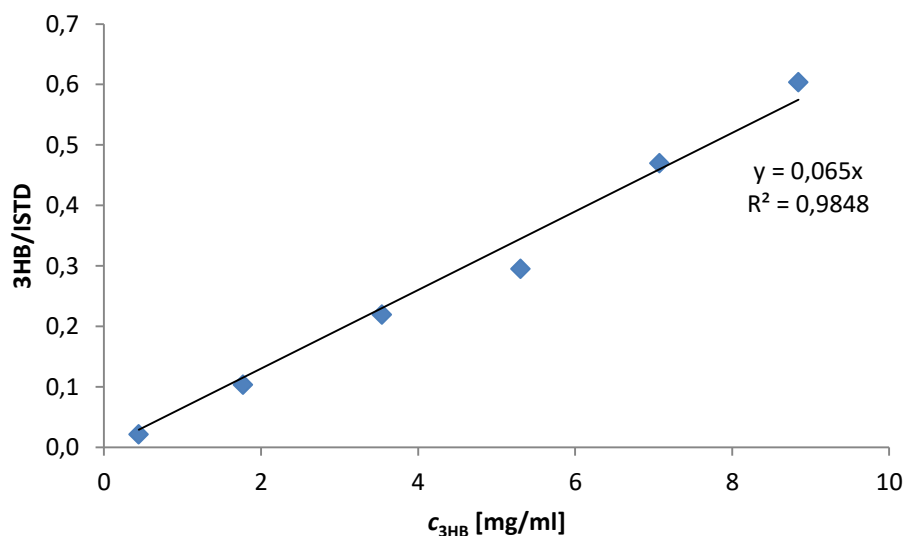
Spektrofotometrickou metodou byl stanoven obsah biomasy u bakterie *Haloferax mediterranei*. Nejvyšší koncentrace buněk byla v kultuře stanovena na konci kultivace, při odběru po 88 hodinách, 5,10 g/l. Nejnižší koncentrace buněk pak byla v kultuře při odběru po 16 hodinách, koncentrace buněk byla stanovena na 0,48 g/l. U spektrofotometrického stanovení biomasy, lze pozorovat lineární trend růstu.

4.2.1.2 Kalibrační přímka pro stanovení obsahu PHA v biomase

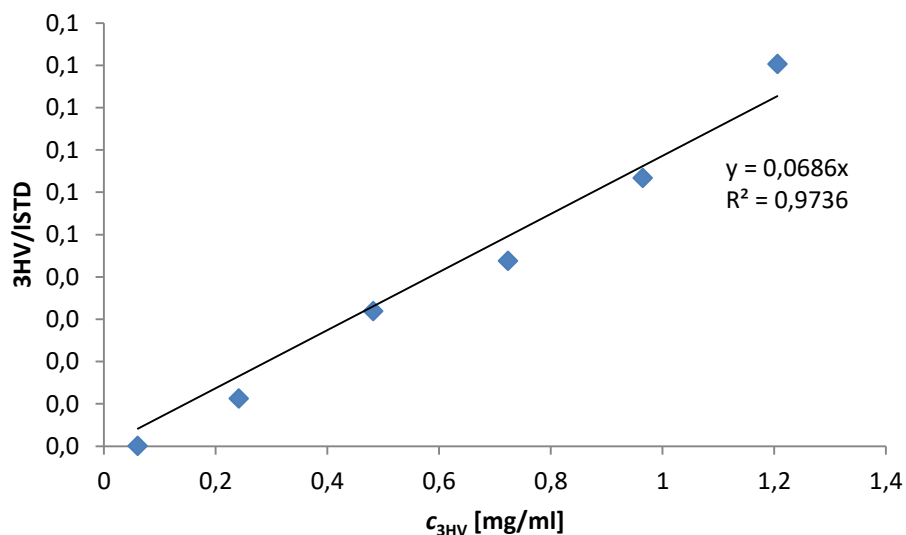
Připravená kalibrační řady roztoků (viz kapitola 3.4.1) byla proměřena na plynovém chromatografu. Z jednotlivých chromatogramů byly odečteny plochy píků přítomných analytů. Kalibrační přímka byla sestavena ze závislosti poměru plochy píků analytů (3HB, 3HV) k internímu standardu (ISTD) na koncentraci látky.

Tabulka 12 - Plochy píků odečtené z chromatogramů kalibračních roztoků

Plocha píku 3HB	Plocha píku 3HV	Plocha píku ISTD	3HB/ISTD	3HV/ISTD
1 689	0	78 848	0,021 4	0
7 730	836	74 823	0,103 3	0,011 2
19 501	2 828	88 894	0,219 4	0,031 8
25 168	3 729	85 268	0,295 2	0,043 7
29 007	3 911	61 755	0,469 7	0,063 3
53 086	7 940	87 967	0,603 5	0,090 3



Obrázek 17 - Kalibrační přímka pro stanovení obsahu 3HB v biomase



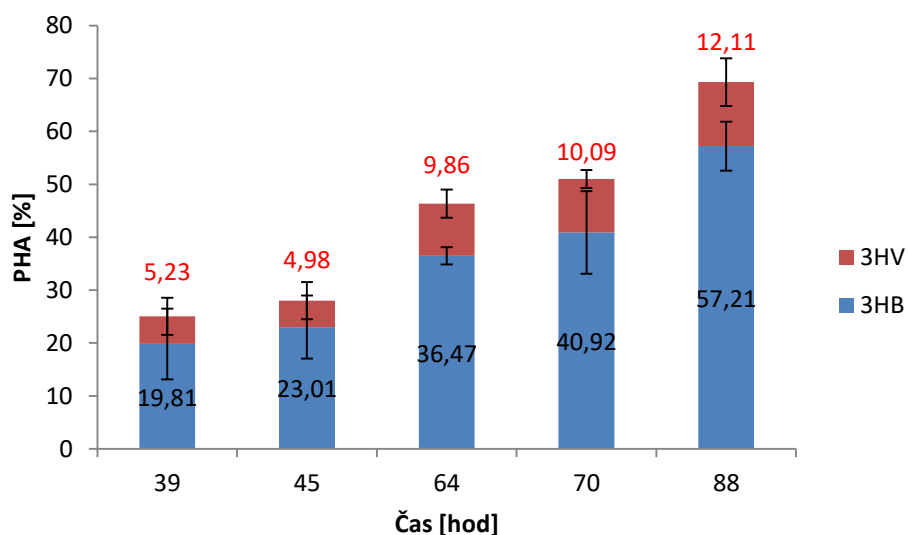
Obrázek 18 - Kalibrační přímka pro stanovení obsahu 3HV v biomase

4.2.2 Stanovení obsahu PHA v biomase

Pomocí plynové chromatografie s FID detektorem byl stanoven obsah polyhydroxyalkanoátů v biomase jednotlivých vzorků (viz kapitola 3.4.2). Plochy píků daných analytů byly odečteny na základě retenčních časů z chromatogramů. Pomocí kalibračních přímek (viz kapitola 4.2.1.2) byl stanoven obsah 3HB a 3HV v biomase.

Tabulka 13 - Obsah 3HB a 3HV v biomase bakterie *Haloferax mediterranei*

doba kultivace [hod]	3HB [%]	smodch	3HV [%]	smodch
39h	19,81	6,71	5,23	3,52
45h	23,01	5,95	4,98	3,50
64h	36,47	1,62	9,86	2,67
70h	40,92	7,81	10,09	1,67
88h	57,21	4,65	12,11	4,52



Obrázek 19 - Obsah 3HB a 3HV v biomase bakterie *Haloferax mediterranei*

Plynovou chromatografií s FID detektorem bylo v kultuře *Haloferax mediterranei* analyzováno největší množství PHA při odběru po 88 hodinách a to 57,21 % PHB a 12,11 % PHV. Nejnížší obsah polyhydroxyalkanoátů byl ve vzorku, jak se dalo očekávat, při odběru po 39 hodinách, kdy byl stanoven obsah 19,81 % PHB a 5,23 % PHV. V časech 16 a 22 hodin nebylo možné provést analýzu z důvodu velmi malého množství biomasy v sušině.

Tabulka 14 - Obsah 3HB v biomase bakterie *Burkholderia sacchari*

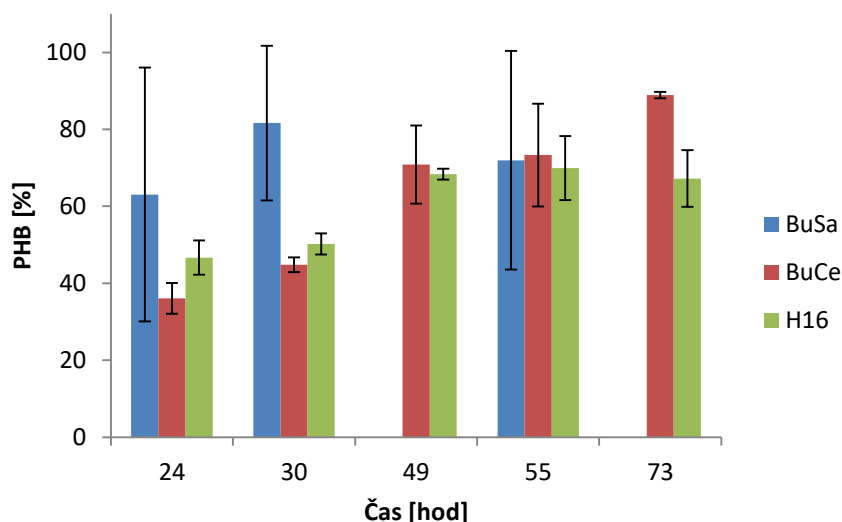
doba kultivace [hod]	3HB [%]	smodch
24	39,7	12,11
30	67,4	16,73
55	72,0	28,42

Tabulka 15 - Obsah 3HB v biomase bakterie *Burkholderia cepacia*

doba kultivace [hod]	3HB [%]	smodch
24	36,1	3,97
30	44,8	1,93
49	70,8	10,17
55	73,3	13,35
73	88,9	0,84

Tabulka 16 - Obsah 3HB v biomase bakterie *Cupriavidus necator* H16

doba kultivace [hod]	3HB [%]	smodch
24	46,7	4,48
30	50,2	2,76
49	68,4	1,38
55	70,0	8,31
73	67,2	7,38



Obrázek 20 - Obsah 3HB v biomase

Pozn.: BuCe – *Burkholderia cepacia*, CN H16 – *Cupriavidus necator* H16, BuSa – *Burkholderia sacchari*

U všech analyzovaných bakterií lze pozorovat trend, jak s přibývajícím časem roste přítomný obsah PHA, ve všech případech PHB. Nejvyšší obsah PHB byl naměřen u *Burkholderia cepacia* na konci kultivace – po 73 hodinách. Nejnižší obsah PHB byl stanoven u bakterie *Cupriavidus necator* H16 při odběru po 24 hodinách, obsah PHB byl roven 46,7 %. U kmene *Burkholderia sacchari* nebylo možné provést analýzu v časech 49 a 73 hodin z důvodu malého množství vysušené biomasy.

4.2.1 Stanovení rychlosti sedimentace

Pomocí analytické centrifugy byla stanovována rychlost sedimentace u vzorků bakteriálních kultur odebíraných v různých časech a obsahující různé koncentrace PHA. Rychlost sedimentace byla vyhodnocována v čase 700 s při transmitanci 45 % a relativní gravitační síle 130 g. Vzorky byly vždy stanovovány ve dvou paralelních pokusech.

Tabulka 17 - Hodnoty rychlosti sedimentace v čase 700 s při transmitanci 45 % a relativní gravitační síle 130 g

Vzorek			Rychlost sedimentace [μm/s]	Průměrná rychlost sedimentace [μm/s]	smodch
2C	BuCe	24h	10,85	9,888	1,361
2C*		24h	8,925		
3C		30h	7,720	7,708	0,017
3C*		30h	7,696		

Vzorek			Rychlost sedimentace [μm/s]	Průměrná rychlost sedimentace [μm/s]	smoch
4C	BuCe	49h	8,405	8,514	0,153
4C*		49h	8,622		
5C		55h	9,007	8,992	0,021
5C*		55h	8,977		
6C		73h	8,817	8,640	0,250
6C*		73h	8,463		
2B	BuSa	24h	9,388	9,448	0,084
2B*		24h	9,507		
3B		30h	9,273	9,430	0,222
3B*		30h	9,587		
4B		49h	10,150	10,004	0,207
4B*		49h	9,857		
5B*		55h	9,940	9,913	0,038
5B		55h	9,886		
6B		73h	10,11	10,029	0,115
6B*		73h	9,947		
2D	CN H16	24h	23,150	22,945	0,290
2D*		24h	22,740		
3D		30h	24,570	24,580	0,014
3D*		30h	24,590		
4D		49h	17,780	17,055	1,025
4D*		49h	16,330		
5D		55h	17,270	16,615	0,926
5D*		55h	15,960		
6D		73h	11,460	11,205	0,361
6D*		73h	10,950		
4E	CN PHB ⁻⁴	49h	16,110	15,495	0,870
4E*		49h	14,880		
5E		55h	11,230	10,975	0,361
5E*		55h	10,720		
6E		73h	9,999	10,195	0,276
6E*		73h	10,390		
4A	HM	45h	4,821	4,342	0,677
4A*		45h	3,863		
5A		64h	4,655	4,560	0,134
5A*		64h	4,465		
6A		70h	3,946	3,816	0,185
6A*		70h	3,685		
7A		88h	3,977	4,735	1,072
7A*		88h	5,493		

Pozn.: BuCe – *Burkholderia cepacia*, CN H16 – *Cupriavidus necator* H16, BuSa – *Burkholderia sacchari*, HM – *Haloferax mediterranei*, CN PHB⁻⁴ – *Cupriavidus necator* PHB⁻⁴

Z naměřených dat je patrné, že nejrychleji sedimentovala kultura *Cupriavidus necator* H16, tato kultura sedimentovala přibližně čtyřikrát rychleji, než kultura *Haloferax*

mediterranei, která byla ze všech analyzovaných kultur vyhodnocena jako nejpomaleji sedimentující.

Analýzou rychlosti sedimentace u bakterie *Burkholderia cepacia* se jako nejrychleji sedimentující projevil vzorek, který byl odebrán v 24. hodině kultivace, kdy průměrná hodnota rychlosti sedimentace byla 9,888 $\mu\text{m/s}$. Nejpomaleji sedimentoval vzorek při odběru po 30 hodinách, který měl průměrnou hodnotu rychlosti sedimentace 7,708 $\mu\text{m/s}$.

Bakterie *Burkholderia sacchari* měla nejrychleji sedimentující vzorek při odběru po 73 hodinách, průměrná hodnota rychlosti sedimentace činila 10,029 $\mu\text{m/s}$. Nejpomaleji sedimentoval vzorek při odběru po 30 hodinách, kdy se průměrná hodnota rychlosti sedimentace rovnala 9,430 $\mu\text{m/s}$.

U bakterie *Cupriavidus necator* H16 se nejrychleji sedimentující vzorek projevil při odběru po 30 hodinách, kdy průměrná hodnota rychlosti sedimentace činila 24,580 $\mu\text{m/s}$. Nejpomaleji sedimentoval vzorek odebraný v 73. hodině, s průměrnou rychlostí sedimentace 11,205 $\mu\text{m/s}$.

U bakterie *Cupriavidus necator* PHB⁴ byl nejrychleji sedimentujícím vzorkem vzorek při odběru po 49 hodinách, s průměrnou hodnotou 15,495 $\mu\text{m/s}$. Nejpomaleji sedimentující byl určen vzorek při odběru po 70 hodinách, při průměrné rychlosti sedimentace 10,195 $\mu\text{m/s}$. Při vyhodnocování výsledků bylo nutné vyřadit vzorky odebrané v 24. a 30. hodině, tyto vzorky neodpovídaly ideální hodnotě transmitance při vyhodnocování z důvodu obsahu malého množství buněk ve vzorku.

Bakterie *Haloferax mediterranei*, která se celkově projevila ze všech měřených bakterií jako nejpomaleji sedimentující, nejrychleji sedimentovala na konci kultivace v 88. hodině při průměrné rychlosti sedimentace 4,735 $\mu\text{m/s}$. Nejpomaleji sedimentoval pak vzorek při odběru po 70 hodinách s průměrnou hodnotou rychlosti sedimentace 3,816 $\mu\text{m/s}$. I v tomto případě bylo nutné při vyhodnocování výsledků odebrat vzorky při odběru po 16, 22 a 39 hodinách, tyto vzorky neodpovídaly ideální hodnotě transmitance při vyhodnocování z důvodu obsahu malého množství buněk ve vzorku.

V tomto případě lze vyvodit, že kultura *Cupriavidus necator* H16, která obsahovala největší obsah PHA, se jevila jako nejrychleji sedimentující. Avšak kultura *Haloferax mediterranei*, která byla stanovena jako nejpomaleji sedimentující, jako jediná obsahovala kopolymer poly(3-hydroxybutyrát-co-3-hydroxyvalerát). Z hodnot lze tedy vyvodit, že množství biomasy pravděpodobně nemá vliv na stanovení rychlosti sedimentace, faktorem ovlivňujícím tyto parametry je spíše obsah a typ PHA v buňce.

4.2.2 Stanovení indexu nestability

Pomocí analytické centrifugy byl stanoven index nestability u analyzovaných bakterií. Index nestability byl vyhodnocován v čase 800 s při relativní gravitační síle 130 g. Vzorky byly vždy stanovovány ve dvou paralelních pokusech.

Tabulka 18 - Hodnoty indexu nestability v čase 800 s při relativní gravitační síle 130 g

Vzorek			Index nestability	Průměrná hodnota indexu nestability	smoch
2C	BuCe	24h	0,261	0,263	0,003
2C*		24h	0,265		
3C		30h	0,255	0,261	0,008
3C*		30h	0,267		
4C		49h	0,306	0,315	0,012
4C*		49h	0,323		
5C		55h	0,326	0,318	0,011
5C*		55h	0,31		
6C		73h	0,314	0,301	0,018
6C*		73h	0,288		
2B	BuSa	24h	0,340	0,342	0,002
2B*		24h	0,343		
3B		30h	0,336	0,348	0,017
3B*		30h	0,360		
4B		49h	0,384	0,381	0,004
4B*		49h	0,378		
5B		55h	0,383	0,376	0,010
5B*		55h	0,369		
6B		73h	0,390	0,372	0,025
6B*		73h	0,354		
2D	CN H16	24h	0,681	0,672	0,013
2D*		24h	0,663		
3D		30h	0,653	0,667	0,020
3D*		30h	0,681		
4D		49h	0,639	0,639	0,001
4D*		49h	0,638		
5D		55h	0,630	0,618	0,017
5D*		55h	0,606		
6D		73h	0,521	0,502	0,027
6D*		73h	0,483		
2E	CN PHB ⁻⁴	24h	0,495	0,481	0,020
2E*		24h	0,467		
3E		30h	0,507	0,522	0,021
3E*		30h	0,536		
4E		49h	0,357	0,361	0,005
4E*		49h	0,364		
5E		55h	0,309	0,302	0,011
5E*		55h	0,294		
6E		73h	0,349	0,346	0,004
6E*		73h	0,343		
1A	HM	16h	0,136	0,131	0,008
1A*		16h	0,125		
2A		22h	0,124	0,110	0,021
2A*		22h	0,095		

Vzorek			Index nestability	Průměrná hodnota indexu nestability	smodch
3A	HM	39h	0,129	0,132	0,004
3A*		39h	0,134		
4A		45h	0,125	0,126	0,001
4A*		45h	0,126		
5A		64h	0,129	0,130	0,001
5A*		64h	0,131		
6A		70h	0,119	0,105	0,020
6A*		70h	0,091		
7A		88h	0,102	0,108	0,008
7A*		88h	0,113		

Pozn.: BuCe – *Burkholderia cepacia*, CN H16 – *Cupriavidus necator* H16, BuSa – *Burkholderia sacchari*, HM – *Haloferax mediterranei*, CN PHB⁻⁴ – *Cupriavidus necator* PHB⁻⁴

Z naměřených dat je patrné, že nejvíce nestabilní byla kultura *Cupriavidus necator* H16, tato kultura byla přibližně šestkrát více nestabilní, než kultura *Haloferax mediterranei*, která se ze všech analyzovaných kultur projevila jako nejstabilnější.

Měřením indexu nestability u bakterie *Burkholderia cepacia* se jako nejvíce nestabilní projevil vzorkem odebraný v 55. hodině, kdy průměrná hodnota indexu nestability byla 0,318. Nejvíce stabilním se ukázal vzorek odebraný v 24. hodině, který měl průměrnou hodnotu indexu nestability 0,263, a vzorek odebraný v 30. hodině s průměrnou hodnotou indexu nestability 0,261.

Bakterie *Burkholderia sacchari* měla nejvíce nestabilní vzorek odebraný v 49. hodině, průměrná hodnota indexu nestability činila 0,381. Nejvíce stabilní vzorek byl při odebrání v 24. hodině, kdy se průměrná hodnota indexu nestability rovnala 0,342.

U bakterie *Cupriavidus necator* H16, jako u jediné z analyzovaných kultur, lze pozorovat trend, kdy s přibývajícím časem roste stabilita kultury. Nejvíce nestabilní se tedy projevil vzorek odebraný v 24. hodině, kdy průměrná hodnota indexu nestability činila 0,672. Nejvíce stabilním vzorkem tak byl vzorek odebraný v 73. hodině, s průměrnou hodnotou indexu nestability 0,502.

U bakterie *Cupriavidus necator* PHB⁻⁴ byl nejvíce nestabilním vzorkem vzorek odebraný v 30. hodině, s průměrnou hodnotou indexu nestability 0,522. Nejvíce stabilní byl určen vzorek odebraný v 55. hodině, při průměrné hodnotě indexu nestability 0,302.

Bakterie *Haloferax mediterranei*, která se celkově projevila ze všech měřených bakterií jako nejstabilnější, měla nejvíce nestabilní vzorek odebraný v 39. hodině při průměrném indexu nestability 0,132 a v 16. hodině a průměrnou hodnotou indexu nestability 0,131. Nejvíce stabilní byl pak vzorek odebraný v 70. hodině s průměrnou hodnotou indexu nestability 0,105.

Z experimentu lze vyvodit, stejně jako u sledování rychlosti sedimentace, že kultura *Cupriavidus necator* H16, která obsahovala největší obsah PHA, se jevila jako nejvíce nestabilní a nejrychleji sedimentující. Kultura *Haloferax mediterranei*, která byla stanovena jako nejstabilnější a zároveň nejpomaleji sedimentující ze studovaných kultur jako jediná obsahovala kopolymer poly(3-hydroxybutyrát-co-3-hydroxylerát). Z hodnot lze tedy vyvodit, stejně jako při měření rychlosti sedimentace, že množství biomasy pravděpodobně nemá vliv na stanovení rychlosti sedimentace, faktorem ovlivňujícím tyto parametry je spíše obsah a typ PHA v buňce.

4.3 Působení stresových faktorů na bakterie

V tomto experimentu byl sledován růst a produkce PHA u bakterie *Cupriavidus necator* H16 a jejího mutantní, PHA neprodukujícího, kmene *Cupriavidus necator* PHB⁻⁴ v závislosti na působení stresových faktorů, teplotního a solného stresu. Nejprve byl stanoven obsah biomasy u obou studovaných bakterií gravimetrickou metodou. U bakterie *Cupriavidus necator* H16 byl také stanoven obsah PHA pomocí plynové chromatografie s FID detektorem. Studované bakterie byly vystaveny teplotnímu stresu po dobu 15 minut ve vodní lázni vyhřáté na předem zvolenou teplotu (viz kapitola 3.5.4.1). Při stresu mrazem byly vzorky umístěny do mrazáku, kde byly uchovány při teplotě -30 °C po určitou dobu (viz kapitola 3.5.4.2). Jako další byl prováděn solný stres, kdy byly vzorky bakterií inkubovány po dobu 4 hodin při 30 °C v přítomnosti různě koncentrovaných roztocích chloridu sodného (viz kapitola 3.5.4.3). Pomocí analytické centrifugy byl stanovován index nestability u analyzovaných vzorků, tedy jaká z analyzovaných bakterií byla v konkrétním stresu nejstabilnější, byla proměřena i rychlost sedimentace a určen vzorek, který sedimentoval nejrychleji, popřípadě nejpomaleji.

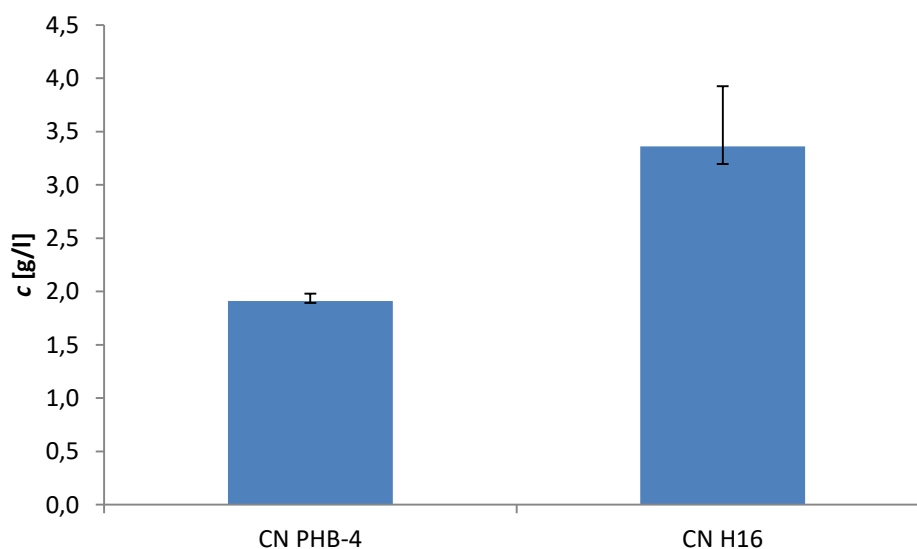
4.3.1 Kalibrace metod

4.3.1.1 Gravimetrické stanovení obsahu biomasy

Gravimetrické stanovení obsahu biomasy bakteriální kultury bylo stanovováno ve dvou paralelních pokusech.

Tabulka 19 - Gravimetrické stanovení obsahu biomasy

Producent	c_1 [g/l]	c_2 [g/l]	\bar{c} [g/l]	smodch
<i>Cupriavidus necator</i> PHB ⁻⁴	1,96	1,86	1,91	0,07
<i>Cupriavidus necator</i> H16	3,76	2,96	3,36	0,57



Obrázek 21 - Gravimetrické stanovení obsahu biomasy

Gravimetrickou metodou byl stanoven obsah biomasy po 72 hodinách kultivace u kultur *Cupriavidus necator* PHB⁻⁴ na 1,91 g/l a *Cupriavidus necator* H16 na 3,36 g/l, tato kultura tedy obsahovala téměř třikrát vyšší koncentraci biomasy než mutantní kmen neprodukující PHA.

4.3.2 Stanovení obsahu PHA v biomase

Pomocí plynové chromatografie s FID detektorem byl stanoven obsah polyhydroxyalkanoátů v biomase jednotlivých vzorků (viz kapitola 3.4.2). Plochy píků daných analytů byly odečteny na základě retenčních časů z chromatogramů. Pomocí kalibračních přímků (viz kapitola 4.2.1.2) byl stanoven obsah 3HB v biomase.

Tabulka 20 - Obsah 3HB v biomase

Producent PHA	3HB [%]	smodch
<i>Cupriavidus necator</i> H16	59,3	2,42

Pomocí plynové chromatografií s FID detektorem byl analyzován obsah PHA v kultuře *Cupriavidus necator* H16. Analyzována byla biomasa po 72 hodinách kultivace, obsah polyhydroxybutyrátu v biomase tvořil 59,3 %.

4.3.3 Působení teplotního stresu na bakterie

4.3.3.1 Stanovení rychlosti sedimentace

Pomocí analytické centrifugy byla stanovována rychlost sedimentace u analyzovaných bakterií. Rychlost sedimentace byla vyhodnocována v čase 1 000 s, při transmitanci 35 % a relativní centrifugační síle 130 g. Vzorky byly vždy stanovovány ve dvou paralelních pokusech.

Tabulka 21 - Hodnoty rychlosti sedimentace v čase 1 000 s při transmitanci 35 % a relativní centrifugační síle 130 g

Vzorek	Rychlost sedimentace [μm/s]	Průměrná rychlost sedimentace [μm/s]	smodch
60 °C H16	6,850	7,009	0,225
60 °C H16*	7,168		
70 °C H16	6,779	6,551	0,323
70 °C H16*	6,322		
80 °C H16*	6,422	6,495	0,103
80 °C H16	6,568		
90 °C H16	7,502	7,336	0,235
90 °C H16*	7,170		
60 °C PHB ⁻⁴	18,160	18,215	0,078
60 °C PHB ⁻⁴ *	18,270		
70 °C PHB ⁻⁴	18,820	18,445	0,530
70 °C PHB ⁻⁴ *	18,070		
80 °C PHB ⁻⁴	19,530	19,210	0,453
80 °C PHB ⁻⁴ *	18,890		
90 °C PHB ⁻⁴	19,120	19,385	0,375
90 °C PHB ⁻⁴ *	19,650		

Pozn.: H16 – *Cupriavidus necator* H16, PHB⁻⁴ – *Cupriavidus necator* PHB⁻⁴

Z naměřených dat lze vidět, že kultura *Cupriavidus necator* H16, která obsahovala PHA, sedimentovala přibližně třikrát pomaleji než kultura *Cupriavidus necator* PHB⁻⁴.

Při vyhodnocení každé kultury zvlášť, tak u bakterie *Cupriavidus necator* H16 nejrychleji sedimentoval vzorek vystavený stresu při teplotě 90 °C, průměrná hodnota rychlosti

sedimentace byla 7,336 $\mu\text{m/s}$. Nejpomaleji sedimentující se ukázal vzorek vystavený stresu při teplotě 80 °C, který měl průměrnou hodnotu rychlosti sedimentace 6,495 $\mu\text{m/s}$.

U bakterie *Cupriavidus necator* PHB⁻⁴ lze pozorovat trend růstu rychlosti sedimentace, nejrychleji sedimentující byl vzorek vystavený stresu také při nejvyšší testované teplotě 90 °C, s průměrnou hodnotou rychlosti sedimentace 19,385 $\mu\text{m/s}$, naopak nejpomaleji sedimentující byl vzorek, kdy byly buňky vystaveny teplotě 70 °C, který měl průměrnou hodnotu rychlosti sedimentace 18,215 $\mu\text{m/s}$.

Vlivem působení vyšší teploty (60 – 90 °C) bylo měřením rychlosti sedimentace u bakterie *Cupriavidus necator* H16 dosaženo velice podobných hodnot 6,322 – 7,502 $\mu\text{m/s}$, stejně tak u bakterie *Cupriavidus necator* PHB⁻⁴, kde byl rozptýl hodnot 18,07 – 19,65 $\mu\text{m/s}$.

4.3.3.2 Stanovení indexu nestability

Pomocí analytické centrifugy byl stanoven index nestability u analyzovaných bakterií. Index nestability byl vyhodnocován v čase 1 000 s při relativní gravitační síle 130 g. Vzorky byly vždy stanovovány ve dvou paralelních pokusech.

Tabulka 22 - Hodnoty indexu nestability v čase 1 000 s při relativní gravitační síle 130 g

Vzorek	Index nestability	Průměrná hodnota indexu nestability	smodch
60 °C H16	0,322	0,322	0,000
60 °C H16*	0,322		
70 °C H16	0,295	0,296	0,001
70 °C H16*	0,296		
80 °C H16*	0,281	0,269	0,017
80 °C H16	0,257		
90 °C H16	0,341	0,334	0,011
90 °C H16*	0,326		
60 °C PHB ⁻⁴	0,467	0,474	0,010
60 °C PHB ⁻⁴ *	0,481		
70 °C PHB ⁻⁴	0,459	0,431	0,040
70 °C PHB ⁻⁴ *	0,402		
80 °C PHB ⁻⁴	0,446	0,465	0,027
80 °C PHB ⁻⁴ *	0,484		
90 °C PHB ⁻⁴	0,485	0,484	0,001
90 °C PHB ⁻⁴ *	0,483		

Pozn.: H16 – *Cupriavidus necator* H16, PHB⁻⁴ – *Cupriavidus necator* PHB⁻⁴

Z naměřených dat lze vidět, že kultura *Cupriavidus necator* H16 je viditelně stabilnější v porovnání s *Cupriavidus necator* PHB⁻⁴.

Centrifugační analýzou buněk bakterie *Cupriavidus necator* H16 se jako nejvíce nestabilní projevil vzorek, který byl vystaven stresu při teplotě 90 °C, průměrná hodnota indexu nestability byla 0,334. Nejvíce stabilním se ukázal vzorek vystavený stresu při teplotě 80 °C, s průměrnou hodnotou indexu nestability 0,269.

U bakterie *Cupriavidus necator* PHB⁻⁴ byl nejvíce nestabilní vzorek vystavený stresu také při teplotě 90 °C, s průměrnou hodnotou indexu nestability 0,484. Nejvíce stabilní se projevil vzorek vystavený stresu při teplotě 70 °C, který měl průměrnou hodnotu indexu nestability 0,431.

Z experimentu lze vyvodit, že kultura *Cupriavidus necator* H16, která obsahovala PHA, se jevila více stabilní než kultura *Cupriavidus necator* PHB⁻⁴. Výsledky z indexu nestability korespondují s výsledky z rychlosti sedimentace. Z hodnot lze vidět, že u bakterie *Cupriavidus necator* PHB⁻⁴ se zahříváním index nestability nějak nemění, spíše kolísá, avšak

u bakterie *Cupriavidus necator* H16 vidíme trend, kdy s rostoucí teplotou klesá index nestability, což může souviset s fázovými přechody polymeru, jako je krystalizace či galomerace granulí.

Vlivem působení vyšší teploty (60 - 90°C) bylo měřením indexu nestability u bakterie *Cupriavidus necator* H16 dosaženo velice podobných hodnot 0,257 – 0,341, stejně tak u bakterie *Cupriavidus necator* PHB⁻⁴, kde byl rozptyl hodnot 0,402 – 0,485

4.3.4 Působení stresu mrazem na bakterie

4.3.4.1 Stanovení rychlosti sedimentace

Pomocí analytické centrifugy byla stanovována rychlost sedimentace u bakteriálních kultur, které byly vystaveny nízkým teplotám (-30 °C) po různě dlouhou dobu. Rychlost sedimentace byla vyhodnocována v čase 500 s, při transmitanci 50 % a relativní centrifugační síle 120 g. Vzorky byly vždy stanovovány ve dvou paralelních pokusech.

Tabulka 23 - Hodnoty rychlosti sedimentace v čase 500 s při transmitanci 50 % a relativní gravitační síle 120 g.

Vzorek			Rychlost sedimentace [μm/s]	Průměrná rychlost sedimentace [μm/s]	smoch
1H H16	1 hod	H16	6,596	6,445	0,214
1H* H16	1 hod*		6,294		
2H H16	2 hod		5,831	6,232	0,567
2H* H16	2 hod*		6,633		
4H H16	4 hod		5,975	6,167	0,272
4H* H16	4 hod*		6,359		
1 PHB ⁻⁴	1 hod	PHB ⁻⁴	26,13	26,605	0,672
1* PHB ⁻⁴	1 hod*		27,08		
2 PHB ⁻⁴	2 hod		18,8	20,660	2,630
2* PHB ⁻⁴	2 hod*		22,52		
4 PHB ⁻⁴	4 hod		25,86	25,415	0,629
4* PHB ⁻⁴	4 hod*		24,970		

Pozn.: H16 – *Cupriavidus necator* H16, PHB⁻⁴ – *Cupriavidus necator* PHB⁻⁴

Kultura *Cupriavidus necator* H16, obsahují PHA, sedimentovala pomaleji než kultura *Cupriavidus necator* PHB⁻⁴.

U bakterie *Cupriavidus necator* H16 lze pozorovat trend růstu rychlosti sedimentace, tudíž jako nejrychleji sedimentující se projevil vzorek vystavený mrazu po dobu 1 hodiny, průměrná hodnota rychlosti sedimentace byla 6,445 μm/s. Nejpomaleji sedimentující se ukázal vzorek vystavený mrazu po dobu 4 hodin, který měl průměrnou hodnotu rychlosti sedimentace 6,167 μm/s.

U bakterie *Cupriavidus necator* PHB⁻⁴ byl nejrychleji sedimentující vzorek vystavený mrazu po dobu 1 hodiny, s průměrnou hodnotou rychlosti sedimentace 26,605 μm/s. Nejpomaleji sedimentující se projevil vzorek vystavený mrazu po dobu 2 hodin, který měl průměrnou hodnotu rychlosti sedimentace 20,66 μm/s.

Vlivem působení nízké teploty (-30 °C) bylo měřením rychlosti sedimentace u bakterie *Cupriavidus necator* H16 dosaženo velice podobných hodnot 5,831 – 6,633 μm/s.

4.3.4.2 Stanovení indexu nestability

Pomocí analytické centrifugy byl stanoven index nestability u analyzovaných bakterií. Index nestability byl vyhodnocován v čase 700 s při relativní gravitační síle 130 g. Vzorky byly vždy stanovovány ve dvou paralelních pokusech.

Tabulka 24 - Hodnoty indexu nestability v čase 700 s při gravitační síle 130 g

Vzorek			Index nestability	Průměrná hodnota indexu nestability	smodch
1H H16	1 hod	H16	0,227	0,219	0,011
1H* H16	1 hod*		0,211		
2H H16	2 hod		0,22	0,230	0,013
2H* H16	2 hod*		0,239		
4H H16	4 hod		0,21	0,204	0,009
4H* H16	4 hod*		0,197		
1 PHB ⁻⁴	1 hod	PHB ⁻⁴	0,522	0,537	0,021
1* PHB ⁻⁴	1 hod*		0,552		
2 PHB ⁻⁴	2 hod		0,467	0,470	0,004
2* PHB ⁻⁴	2 hod*		0,472		
4 PHB ⁻⁴	4 hod		0,497	0,511	0,020
4* PHB ⁻⁴	4 hod*		0,525		

Pozn.: H16 – *Cupriavidus necator* H16, PHB⁻⁴ – *Cupriavidus necator* PHB⁻⁴

Byl potvrzen trend z předchozích experimentů, že kultura *Cupriavidus necator* H16 je stabilnější než kultura *Cupriavidus necator* PHB⁻⁴.

Pokud vyhodnotím každou kultura zvlášť, tak u bakterie *Cupriavidus necator* H16 se jako nejvíce nestabilní projevil vzorek vystavený mrazu po dobu 2 hodin, průměrná hodnota indexu nestability byla 0,230. Nejvíce stabilním se ukázal vzorek vystavený mrazu po dobu 4 hodin, který měl průměrnou hodnotu indexu nestability 0,204. Hodnoty indexu nestability jsou u jednotlivých mrazících cyklů velice podobné a je tedy pravděpodobné, že stres ve formě nízké teploty neměl na tento parametr zásadní vliv.

U bakterie *Cupriavidus necator* PHB⁻⁴ byl nejvíce nestabilní vzorek vystavený mrazu po dobu 1 hodiny, s průměrnou hodnotou indexu nestability 0,537. Nejvíce stabilní se projevil vzorek vystavený mrazu po dobu 2 hodin, který měl průměrnou hodnotu indexu nestability 0,470.

Vlivem působení nízké teploty (-30 °C) bylo měřením indexu nestability u bakterie *Cupriavidus necator* H16 dosaženo velice podobných hodnot 0,197 – 0,239, stejně tak u bakterie *Cupriavidus necator* PHB⁻⁴, kde byl rozptyl hodnot 0,467 – 0,552. Vliv nízkých teplot na stabilitu i rychlost sedimentace nebyl nijak zásadní

4.3.5 Působení solného stresu na bakterie

4.3.5.1 Stanovení rychlosti sedimentace

Pomocí analytické centrifugy byla stanovována rychlost sedimentace u bakterií, které byly vystaveny prostředí o různé koncentraci soli (50 – 200 g/l). Rychlost sedimentace byla vyhodnocována v čase 500 s při transmitanci 40 % a relativní centrifugační síle 120 g. Vzorky byly vždy stanovovány ve dvou paralelních pokusech.

Tabulka 25 - Hodnoty rychlosti sedimentace v čase 500 s při transmitanci 40 % a relativní gravitační síle 120 g.

Vzorek			Rychlost sedimentace [μm/s]	Průměrná rychlost sedimentace [μm/s]	smodch
B	Blank	CN H16	6,812	6,681	0,185
B 1	Blank		6,55		
50	50 g/l		5,465	5,464	0,001
50 1	50 g/l		5,463		
100	100 g/l		4,845	4,951	0,150
100 1	100 g/l		5,057		
150	150 g/l		3,643	3,691	0,067
150 1	150 g/l		3,738		
200	200 g/l		3,161	2,743	0,591
200 1	200 g/l		2,325		
B*	Blank	CN PHB ⁻⁴	27,47	28,220	1,061
B*1	Blank		28,97		
50*	50 g/l		25,25	24,505	1,054
50* 1	50 g/l		23,76		
100*	100 g/l		20,70	19,920	1,103
100* 1	100 g/l		19,14		
150*	150 g/l		18,29	17,965	0,460
150* 1	150 g/l		17,64		
200*	200 g/l		25,31	27,950	3,734
200* 1	200 g/l		30,59		

Pozn.: CN H16 – *Cupriavidus necator* H16, CN PHB⁻⁴ – *Cupriavidus necator* PHB⁻⁴, Blank – vzorek buněčné kultury

Z Tabulka 25 - Hodnoty rychlosti sedimentace v čase 500 s při transmitanci 40 % a relativní gravitační síle 120 g. je patrné, že s přibývajícím koncentrací roztoku NaCl klesá rychlost sedimentace, a to jak u PHA produkujícího kmene, tak u jeho mutantní formy. Pouze u bakterie *Cupriavidus necator* PHB⁻⁴ se vzorek s roztokem NaCl o koncentraci 200g/l je hodnota rychlosti sedimentace odlišná od trendu měření, což může být způsobeno použitou chybou měření.

U bakterie *Cupriavidus necator* H16 se jako nejrychleji sedimentující projevila vzorek blank, tedy čistá kultura *Cupriavidus necator* H16, průměrná hodnota rychlosti sedimentace byla 6,681 μm/s. Nejpomaleji sedimentující se ukázal vzorek s roztokem NaCl o koncentraci 200 g/l, který měl průměrnou rychlost sedimentace 2,743 μm/s.

U bakterie *Cupriavidus necator* PHB⁻⁴ nejrychleji sedimentoval také vzorek blank, tedy čistá kultura *Cupriavidus necator* PHB⁻⁴, s průměrnou hodnotou rychlosti sedimentace 28,22 μm/s. Nejpomaleji sedimentující se projevila vzorek s roztokem NaCl o koncentraci 150 g/l, který měl průměrnou rychlost sedimentace 17,965 μm/s.

Kultura *Cupriavidus necator* H16, která obsahovala větší množství biomasy než kultura *Cupriavidus necator* PHB⁻⁴ a zároveň obsahovala PHA, se i zde jevila jako pomaleji sedimentující a více stabilní.

4.3.5.2 Stanovení indexu nestability

Pomocí analytické centrifugy byl stanoven index nestability u bakteriálních kultur, které byly inkubovány po dobu 4 hodin v přítomnosti NaCl v rozsahu koncentrací od 50 do 200 g/l.

Index nestability byl vyhodnocován v čase 700 s při relativní gravitační síle 130 g. Vzorky byly vždy stanovovány ve dvou paralelních pokusech.

Tabulka 26 - Hodnoty indexu nestability v čase 700 s při relativní gravitační síle 130 g

Vzorek			Index nestability	Průměrná hodnota indexu nestability	smodch
B	Blank	CN H16	0,238	0,234	0,006
B 1	Blank		0,23		
50	50 g/l		0,197	0,191	0,009
50 1	50 g/l		0,184		
100	100 g/l		0,149	0,154	0,006
100 1	100 g/l		0,158		
150	150 g/l		0,123	0,120	0,004
150 1	150 g/l		0,117		
200	200 g/l		0,081	0,083	0,002
200 1	200 g/l		0,084		
B*	Blank	CN PHB ⁻⁴	0,605	0,617	0,017
B*1	Blank		0,629		
50*	50 g/l		0,6	0,591	0,013
50* 1	50 g/l		0,581		
100*	100 g/l		0,478	0,470	0,012
100* 1	100 g/l		0,461		
150*	150 g/l		0,405	0,397	0,011
150* 1	150 g/l		0,389		
200*	200 g/l		0,334	0,290	0,062
200* 1	200 g/l		0,246		

Pozn.: CN H16 – *Cupriavidus necator* H16, CN PHB⁻⁴ – *Cupriavidus necator* PHB⁻⁴, Blank – vzorek buněčné kultury

I v tomto případě byl potvrzen trend z předchozího měření, kdy bakterie *Cupriavidus necator* H16 je přibližně třikrát stabilnější než bakterie *Cupriavidus necator* PHB⁻⁴.

Je patrné, že s přibývajícím koncentrací roztoku NaCl je v obou případech trend stejný, tudíž roste stabilita, což je s největší pravděpodobností způsobeno změnou osmotické síly v buňkách po přidání roztoku NaCl.

U bakterie *Cupriavidus necator* H16 se jako nejvíce nestabilní projevil vzorek blank, tedy čistá kultura *Cupriavidus necator* H16, průměrná hodnota indexu nestability byla 0,234. Nejvíce stabilním se ukázal vzorek s roztokem NaCl o koncentraci 200 g/l, který měl průměrnou hodnotu indexu nestability 0,083.

U bakterie *Cupriavidus necator* PHB⁻⁴ byl nejvíce nestabilní také vzorek blank, tedy čistá kultura *Cupriavidus necator* PHB⁻⁴, s průměrnou hodnotou indexu nestability 0,617. Nejvíce stabilní se projevil vzorek s roztokem NaCl o koncentraci 200 g/l, který měl průměrnou hodnotu indexu nestability 0,290.

Stejně jako v předchozích případech lze vyvodit, že kultura *Cupriavidus necator* H16, která obsahovala PHA, se jevila více stabilní a pomaleji sedimentující než kultura *Cupriavidus necator* PHB⁻⁴ neprodukující polyhydroxyalkanoáty.

Výsledky indexu nestability a rychlosti sedimentace se liší, měření může být ovlivněno nastavením hodnot transmitance.

4.4 Vliv složení média na centrifugaci PHA produkujících bakterií

V tomto pokusu bylo hlavním úkolem porovnat bakterii *Cupriavidus necator* H16 s jejím mutantním kmenem *Cupriavidus necator* PHB⁻⁴. Obě ze studovaných bakterií byly kultivovány na dvou médiích – minerálním (produkčním) médiu (viz kapitola 3.2.3) a médiu bohatém na dusík Nutrient Broth (viz kapitola 3.2.2). Nejprve byl u obou bakterií stanoven obsah biomasy spektrofotometrickou metodou. Obsah PHA byl stanoven pouze u bakterie *Cupriavidus necator* H16, protože bakterie *Cupriavidus necator* PHB⁻⁴ neobsahuje polyhydroxyalkanoáty. Pomocí analytické odstředivky byla provedena centrifugační analýza sledovaných bakterií a změřen index nestability a rychlost sedimentace.

4.4.1 Kalibrace metod

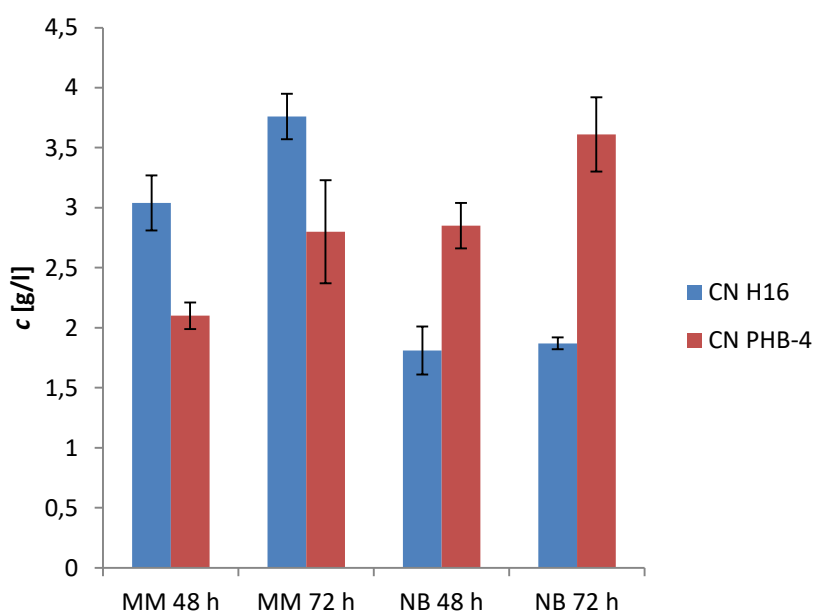
4.4.1.1 Stanovení obsahu biomasy

Před samotným měřením zákalu bylo nutné vzorky naředit, aby hodnota absorbance byla v odpovídajícím rozmezí kalibrační přímky. Absorbance byla měřena při vlnové délce 630 nm, jako blank byla použita destilovaná voda. Použitá rovnice kalibrační přímky pro stanovení obsahu biomasy pro bakterie *Cupriavidus necator* PHB⁻⁴ a *Cupriavidus necator* H16 má tvar $y = 4,0703 \cdot x$.

Tabulka 27 - Spektrofotometrické stanovení obsahu biomasy

Producent		Ø A	c [g/l]	smoch
MM 48 h	CN H16	0,206	3,04	0,23
MM 72 h		0,255	3,76	0,19
NB 48 h		0,123	1,81	0,20
NB 72 h		0,127	1,87	0,05
MM 48 h	CN PHB ⁻⁴	0,143	2,10	0,11
MM 72 h		0,190	2,80	0,43
NB 48 h		0,193	2,85	0,19
NB 72 h		0,245	3,61	0,31

Pozn.: MM – minerální médium, NB – Nutrient Broth, H16 – *Cupriavidus necator* H16, PHB⁻⁴ – *Cupriavidus necator* PHB⁻⁴



Obrázek 22 - Spektrofotometrické stanovení obsahu biomasy

Pozn.: MM – minerální médium, NB – Nutrient Broth, H16 – *Cupriavidus necator* H16, PHB⁻⁴ – *Cupriavidus necator* PHB⁻⁴

Spektrofotometrickou metodou měření intenzity zákalu bylo stanoveno největší množství biomasy u kultury *Cupriavidus necator* H16 v minerálním médiu při odběru po 72 hodinách, koncentrace biomasy byla 3,76 g/l. Nejnižší hodnoty koncentrace biomasy byly naměřeny u bakterie *Cupriavidus necator* H16 při kultivaci v médiu Nutrient Broth po dobu 48 hodin, kdy bylo množství biomasy 1,81 g/l.

V kultuře *Cupriavidus necator* PHB⁻⁴ bylo nejvyšších výtěžků biomasy dosaženo s médiem Nutrient Broth po dobu 72 hodin, koncentrace biomasy byla stanovena na 3,61 g/l, nejnižší koncentrace biomasy byla naměřena u bakterie *Cupriavidus necator* PHB⁻⁴ při použití minerálního média (48 hodin), biomasa byla 2,10 g/l.

4.4.2 Stanovení rychlosti sedimentace

Pomocí analytické centrifugy byla stanovována rychlost sedimentace u bakterií, které byly kultivovány na minerálním (produkčním) médiu a komplexním médiu – Nutrient Broth. Rychlost sedimentace byla vyhodnocována v čase 400 s, při transmitanci 65 % a relativní centrifugační síle 530 g. Vzorky byly vždy stanovovány ve dvou paralelních pokusech.

Tabulka 28 - Hodnoty rychlosti sedimentace v čase 400 s při transmitanci 65 % a relativní gravitační síle 530 g.

Vzorek	Rychlost sedimentace [μm/s]	Průměrná rychlost sedimentace [μm/s]	smodch
MM H16 48h	33,16	34,12	1,36
MM H16* 48h	35,08		
MM H16 72h	35,56	35,95	0,54
MM H16* 72h	36,33		
NB H16 48h	72,68	73,71	1,45
NB H16* 48h	74,73		
NB H16 72h	74,60	72,57	2,88
NB H16* 72h	70,53		
MM PHB ⁻⁴ 48h	67,82	68,71	1,25
MM PHB ⁻⁴ * 48h	69,59		
MM PHB ⁻⁴ 72h	53,04	52,70	0,48
MM PHB ⁻⁴ * 72h	52,36		
NB PHB ⁻⁴ 48h	30,84	30,30	0,76
NB PHB ⁻⁴ * 48h	29,76		
NB PHB ⁻⁴ 72h	33,97	34,36	0,55
NB PHB ⁻⁴ * 72h	34,75		

Pozn.: MM – minerální médium, NB – Nutrient Broth, H16 – *Cupriavidus necator* H16, PHB⁻⁴ – *Cupriavidus necator* PHB⁻⁴

Z Tabulka 28 vyplývá, že bakterie *Cupriavidus necator* H16 kultivovaná na Nutrient Broth médiu rychleji sedimentovala, bylo dosaženo velice podobných hodnot 70,53 – 74,6 μm/s. Nejpomaleji bakterie *Cupriavidus necator* H16 kultivovaná na minerálním médiu, kdy opět bylo dosaženo velice podobných hodnot 33,16 – 36,33 μm/s.

Bakterie *Cupriavidus necator* PHB⁻⁴ kultivovaná na minerálním médiu sedimentovala nejrychleji při kultivaci po dobu 48 hodin, hodnota rychlosti sedimentace byla stanovena v průměru na 68,71 μm/s. Nejpomaleji tato bakterie sedimentovala při kultivaci na Nutrient

Broth médiu při době kultivace 48 hodin, kdy rychlost sedimentace dosahovala v průměru 30,30 $\mu\text{m/s}$.

Nelze pozorovat žádný významný trend, je zřejmé, že nejdůležitější je typ bakterie, ale doba kultivace ani typ kultivačního média nemají významný vliv na sedimentační vlastnosti.

4.4.3 Stanovení indexu nestability

Pomocí analytické centrifugy byl stanoven index nestability u bakterií, které byly kultivovány na minerálním (produkčním) médiu a komplexním médiu – Nutrient Broth. Index nestability byl vyhodnocován v čase 400 s a relativní centrifugační síle 530 g. Vzorky byly vždy stanovovány ve dvou paralelních pokusech

Tabulka 29 - Hodnoty indexu nestability v čase 400 s při relativní gravitační síle 530 g.

Vzorek	Index nestability	Průměrná hodnota indexu nestability	smodch
MM H16 48h	0,571	0,575	0,005
MM H16* 48h	0,578		
MM H16 72h	0,631	0,638	0,010
MM H16* 72h	0,645		
NB H16 48h	0,734	0,737	0,004
NB H16* 48h	0,739		
NB H16 72h	0,749	0,739	0,015
NB H16* 72h	0,728		
MM PHB ⁻⁴ 48h	0,739	0,736	0,004
MM PHB ^{-4*} 48h	0,733		
MM PHB ⁻⁴ 72h	0,755	0,766	0,015
MM PHB ^{-4*} 72h	0,776		
NB PHB ⁻⁴ 48h	0,625	0,602	0,033
NB PHB ^{-4*} 48h	0,579		
NB PHB ⁻⁴ 72h	0,596	0,588	0,012
NB PHB ^{-4*} 72h	0,579		

Pozn.: MM – minerální médium, NB – Nutrient Broth, H16 – *Cupriavidus necator* H16, PHB⁻⁴ – *Cupriavidus necator* PHB⁻⁴

Z naměřených dat vyplývá, že bakterie *Cupriavidus necator* H16 kultivovaná na minerálním médiu je v porovnání s kulturou na Nutrient Broth daleko více stabilní. Naopak nejvíce nestabilní byla bakterie kultivovaná na Nutrient Broth médiu po 72 hodinách kultivace, kdy index nestability měl průměrnou hodnotu 0,739. Nejvíce stabilní pak byla bakterie *Cupriavidus necator* H16 v minerálním médiu, protože buňky na minerálním (produkčním) médiu by měly obsahovat více PHA, jelikož minerální médium poskytuje optimální podmínky pro produkci polymeru, avšak Nutrient Broth je vhodné díky vysokému obsahu dusíku pro buněčný růst.

Bakterie *Cupriavidus necator* PHB⁻⁴ kultivovaná na Nutrient Broth médiu je v porovnání s kulturou na minerálním médiu stabilnější. Nejvíce nestabilní byla bakterie *Cupriavidus necator* PHB⁻⁴ kultivovaná na minerálním médiu (72 hodin), kdy byla hodnota indexu nestability průměrně 0,766. Nejstabilnější se ukázalo prostředí Nutrient Broth po dobu kultivace 72 hodin s hodnotou indexu nestability průměrně 0,588.

Byl potvrzen trend z předchozího měření, že na druhu kultivačního média záleží, ale každá z bakterií je jinak stabilní v kultivovaném médiu. U bakterie *Cupriavidus necator* H16 byl nejvyšší obsah biomasy, určený spektrofotometrickou metodou, v minerálním médiu, zároveň se bakterie kultivovaná v tomto médiu ukázala jako stabilnější. Naopak u bakterie

Cupriavidus necator PHB⁻⁴ byl nejvyšší obsah biomasy, určený spektrofotometrickou metodou, byla bakterie *Cupriavidus necator* PHB⁻⁴ kultivována na Nutrient Broth stabilnější.

Nelze pozorovat žádný významný trend, je zřejmé, že nejdůležitější je typ bakterie, ale doba kultivace ani typ kultivačního média nemají významný vliv na sedimentační vlastnosti.

4.5 Sledování růstu kvasinky *Saccharomyces cerevisiae* v různých médiích

Kvasinka *Saccharomyces cerevisiae* byla kultivována ve dvou různých médiích – YPD médiu a minerálním médiu. Bylo sledováno, ve které z kultivačních prostředí se jeví tato kvasinka jako rychleji sedimentující a stabilnější. Nejprve byl stanoven obsah biomasy v obou z daných médií gravimetrickou metodou. Pomocí analytické odstředivky byl poté studován index nestability a rychlost sedimentace kvasinky *Saccharomyces cerevisiae*.

4.5.1 Kalibrace metod

4.5.1.1 Stanovení obsahu biomasy

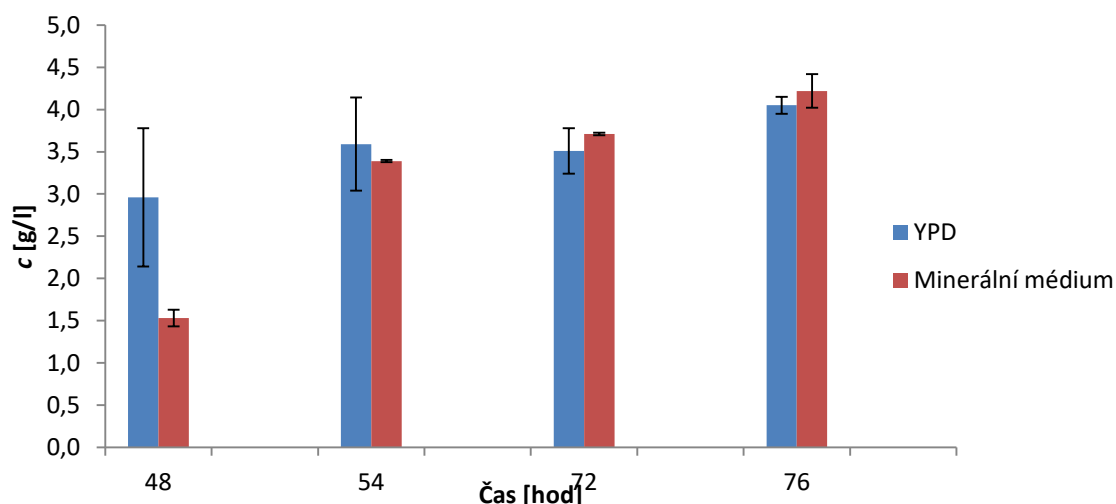
Gravimetrické stanovení obsahu biomasy kvasinkové kultury bylo stanovováno ve dvou paralelních pokusech.

Tabulka 30 - Gravimetrické stanovení obsahu biomasy v YPD médiu

dobu kultivace [hod]	c_1 [g/l]	c_2 [g/l]	\bar{c} [g/l]	smodch
48	3,54	2,38	2,96	0,82
54	3,20	3,98	3,59	0,55
72	3,32	3,70	3,51	0,27
76	4,12	3,98	4,05	0,10

Tabulka 31 - Gravimetrické stanovení obsahu biomasy v minerálním médiu

dobu kultivace [hod]	c_1 [g/l]	c_2 [g/l]	\bar{c} [g/l]	smodch
48	1,46	1,60	1,53	0,10
54	3,40	3,38	3,39	0,01
72	3,70	3,72	3,71	0,01
76	4,08	4,36	4,22	0,20



Obrázek 23 - Gravimetrické stanovení obsahu biomasy

Gravimetrickou metodou byl stanoven obsah biomasy u kvasinky *Saccharomyces cerevisiae*. Nejvyšší koncentrace buněk byla v kultuře *Saccharomyces cerevisiae* při kultivaci v minerálním médiu po dobu 76 hodinách. Nejnižší koncentrace buněk pak byla v kultuře *Saccharomyces cerevisiae* při kultivaci v minerálním médiu po dobu 48 hodin.

4.5.2 Stanovení rychlosti sedimentace

Pomocí analytické centrifugy byla stanovována rychlost sedimentace u kvasinky *Saccharomyces cerevisiae*. Rychlost sedimentace byla vyhodnocována v čase 800 s, při transmitanci 55 % a relativní centrifugační síle 5,0 g. Vzorky byly vždy stanovovány ve dvou paralelních pokusech.

Tabulka 32 - Hodnoty rychlosti sedimentace v čase 800 s při transmitanci 55 % a relativní centrifugační síle 5,0 g

Vzorek	Rychlost sedimentace [μm/s]	Průměrná rychlost sedimentace [μm/s]	smodch
YPD 48h	14,55	15,36	1,14
YPD 48h *	16,16		
YPD 54h	20,98	22,25	1,79
YPD 54h *	23,51		
YPD 72h	15,99	16,16	0,23
YPD 72h *	16,32		
YPD 76h	16,74	16,78	0,06
YPD 76h *	16,82		
PMM 48h	16,77	19,91	4,44
PMM 48h *	23,05		
PMM 54h	22,25	20,66	2,26
PMM 54h *	19,06		
PMM 72h	22,42	22,49	0,10
PMM 72h *	22,56		
PMM 76h	19,97	19,97	0,01
PMM 76h *	19,96		

Pozn.: PMM – minerální médium

Z hodnot v Tabulka 32 - Hodnoty rychlosti sedimentace v čase 800 s při transmitanci 55 % a relativní centrifugační síle 5,0 g byla nejrychlejší sedimentace kvasinky *Saccharomyces cerevisiae* kultivované na YPD médiu po dobu 54 hodin, kdy průměrná hodnota rychlosti sedimentace dosahovala 22,25 μm/s. Nejpomalejší sedimentace byla u kvasinky kultivované v YPD médiu po dobu 48 hodin, průměrná hodnota rychlosti sedimentace se rovnala 15,355 μm/s.

Kvasinka *Saccharomyces cerevisiae* kultivovaná v minerálním médiu po dobu 76 hodin se projevila jako nejrychleji sedimentující, průměrná hodnoty rychlosti sedimentace byla 19,960 μm/s. Nejpomalejší sedimentace byla u kvasinky *Saccharomyces cerevisiae* při kultivaci na YPD médiu po dobu 54 hodin, kdy průměrná hodnota rychlosti sedimentace činila 17,53 μm/s. Při kultivaci kvasinky na YPD médiu byly hodnoty indexu nestability velmi podobné, pohybovaly se v rozmezí 16,77 – 17,53 μm/s.

4.5.3 Stanovení indexu nestability

Pomocí analytické centrifugy byl stanoven index nestability u kvasinky *Saccharomyces cerevisiae*, která byla kultivována v produkčním médiu (viz kapitola 3.2.4) a komplexním

médium (viz kapitola 3.2.2), které bylo bohaté na dusík. Index nestability byl vyhodnocován v čase 800 s při relativní centrifugační síle 5,0 g. Vzorky byly vždy stanovovány ve dvou paralelních pokusech.

Tabulka 33 - Hodnoty indexu nestability v čase 800 s při relativní centrifugační síle 5,0 g

Vzorek	Index nestability	Průměrná hodnota indexu nestability	smodch
YPD 48h *	0,524	0,499	0,036
YPD 48h	0,473		
YPD 54h	0,553	0,546	0,010
YPD 54h *	0,539		
YPD 72h	0,534	0,525	0,013
YPD 72h *	0,515		
YPD 76h	0,580	0,562	0,025
YPD 76h *	0,544		
PMM 48h	0,548	0,595	0,066
PMM 48h *	0,642		
PMM 54h	0,627	0,605	0,031
PMM 54h *	0,583		
PMM 72h	0,600	0,606	0,008
PMM 72h *	0,612		
PMM 76h	0,629	0,616	0,019
PMM 76h *	0,602		

Pozn.: PMM – minerální médium

Podle hodnot z

Tabulka 33 - Hodnoty indexu nestability v čase 800 s při relativní centrifugační síle 5,0 g byl nejvyšší index nestability kvasinky *Saccharomyces cerevisiae* kultivované na YPD médiu po dobu 76 hodin, kdy průměrná hodnota indexu nestability dosahovala 0,562. Nejstabilnější byla kvasinka *Saccharomyces cerevisiae* kultivovaná na YPD médiu po dobu 48 hodin, průměrná hodnota indexu nestability se rovnala 0,499. Hodnoty indexu nestability pro YPD médium si byly velmi podobné 0,473 – 0,580.

Obecně se buňky kultivované v minerálním médiu projeví jako nejvíce nestabilní. Hodnota indexu nestability buněk po 76 hodinách kultivace v minerálním médiu byla 0,616. Nejstabilnější byly buňky po dobu 48 hodin kultivace, kdy průměrná hodnota indexu nestability byla 0,595. Stejně jako u buněk kultivovaných s použitím minerálního média, tak i u YPD média dosahovaly hodnoty indexu nestability velmi podobných hodnot 0,548 – 0,595.

Celkově si hodnoty indexu nestability, stejně jako u rychlosti sedimentace, byly podobné, pohybovaly se v malém rozmezí hodnot 0,473 – 0,595.

5 ZÁVĚR

Cílem této bakalářské práce bylo stanovit sedimentační potenciál, především index nestability a rychlost sedimentace, v závislosti na kultivačních podmínkách studovaných mikroorganismů.

Pro experimentální část byly sledovány bakteriální kmeny, které za vhodných podmínek tvoří polyhydroxyalkanoáty – *Haloferax mediterranei*, *Burkholderia cepacia*, *Burkholderia sacchari*, *Cupriavidus necator* H16 a mutantní kmen *Cupriavidus necator* PHB⁻⁴ neprodukující již zmíněné polyhydroxyalkanoáty. Studium se soustředilo i na kvasinku *Saccharomyces cerevisia*, jejíž sedimentace hraje podstatnou roli v důležitých biotechnologických procesech.

V prvním experimentu bylo sledováno působení vody na bakterii *Haloferax mediterranei*. K této bakterii bylo přidáváno předem definované množství vody, čímž byla modelována různá osmotická síla prostředí. Následně byla u bakteriální suspenze pomocí analytické centrifugy stanovena rychlost sedimentace a hodnota indexu nestability. Z experimentálně získaných výsledků lze vyvodit, že s přibývajícím množstvím vody přítomné v bakteriální kultuře *Haloferax mediterranei* roste nestabilita a rychlost sedimentace vzorku, je to způsobeno tím, že snížením osmotické síly v prostředí dojde k narušení buněčných stěn bakterie *Haloferax mediterranei*, buňky popraskají, tento děj má vliv na rychlost sedimentace i stability vzorku.

Ve druhém experimentu byl studován růst a sedimentační vlastnosti bakterií *Haloferax mediterranei*, *Burkholderia cepacia*, *Burkholderia sacchari*, *Cupriavidus necator* H16 a *Cupriavidus necator* PHB⁻⁴. Jako nejvíce nestabilní a zároveň nejrychleji sedimentující se ukázala bakterie *Cupriavidus necator* H16. Nejvíce stabilní, tudíž nejpomaleji sedimentující bakterií byla bakterie *Haloferax mediterranei*. Na základě experimentálního posouzení indexu nestability a rychlosti sedimentace je možné předpokládat, že sedimentační vlastnosti jsou do jisté míry kmenově specifické a zdá se, že jsou ovlivněny obsahem PHA v bakteriálních buňkách. U bakterie *Cupriavidus necator* H16, kde byla nejvyšší přítomnost obsahu polyhydroxybutyrátu, byl vzorek nejvíce nestabilním a nejrychleji sedimentujícím.

Bakterie *Cupriavidus necator* H16 a mutantní kmen *Cupriavidus necator* PHB⁻⁴ byly ve třetím experimentu vystaveny teplotnímu a solnému stresu. Při teplotním stresu byly bakterie vystaveny vysokým teplotám 60 až 90 °C po dobu 15 minut nebo mražení (-30 °C) po dobu 1 – 4 hodin. Během solného stresu byl k bakteriální kultuře přidáván roztok NaCl o koncentraci 50 – 200 g/l. Ve všech z výše zmiňovaných experimentů byla kultura *Cupriavidus necator* H16 stabilnější a pomaleji sedimentující než kultura *Cupriavidus necator* PHB⁻⁴. Z experimentálních výsledků lze vypožorovat, že teplota a mráz, z důvodu dosažených velmi podobných hodnot, měl pouze nepatrný vliv na index nestability a rychlost sedimentace analyzovaného vzorku. Významnější trend byl pozorován pouze u kultury *Cupriavidus necator* H16, kdy s rostoucí teplotou expozice mírně klesal index nestability buněk. Avšak při solném stresu bylo dosaženo trendu rychlosti sedimentace a nestability, s rostoucí koncentrací roztoku NaCl v kultuře, klesá index nestability a rychlost sedimentace vzorku, což pravděpodobně, spíše než se změnou vlastností buněk, souvisí se změnou vlastností prostředí.

V dalším experimentu se porovnával vliv složení média na centrifugaci PHA produkujících bakterií. Porovnávala byla bakterie *Cupriavidus necator* H16 a její mutantní kmen, neprodukující PHA, *Cupriavidus necator* PHB⁻⁴. Přestože se jedná o téměř stejné bakterie, lišící se pouze schopností akumulovat PHB v biomase, bylo zjištěno, že každá ze studovaných bakterií je rychleji sedimentující či stabilnější při kultivaci v jiném médiu. Bakterie *Cupriavidus necator* H16 dosahovala nejnižšího indexu nestability a nejnižší rychlosti sedimentace při kultivaci v minerálním médiu, přičemž bakterie *Cupriavidus necator* PHB⁻⁴

nejnižšího indexu nestability a nejnižší rychlosti sedimentace dosahovala při kultivaci v Nutrient Broth médiu.

Jako poslední byla studována kvasinka *Saccharomyces cerevisiae* při růstu v různých typech média – YPD médiu a minerálním médiu. Z experimentálních výsledků měla volba média pouze nepatrný vliv na rychlost sedimentace či stability kvasinky, hodnoty indexu nestability i rychlosti sedimentace vykazovaly příliš malé rozpětí hodnot, proto lze velmi těžko určit, které z daných médií je pro kvasinku *Saccharomyces cerevisiae* z hlediska stability a sedimentace vhodnější.

6 SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- [1] KÜCK, H.-U. a Nicole FRANKENBERG-DINKEL. *Biotechnology*. 1. Německo: De Gruyter, 2015. De Gruyter textbook. ISBN 978-311-0341-102.
- [2] *Distillation: Operation and Applications* [online]. Dortmund: Elsevier, 2014 [cit. 2017-03-02]. ISBN 978-0-12386-877-0. Dostupné z: http://app.knovel.com/web/toc.v/cid:kpDOA00004/viewerType:toc/root_slug:distillation-operation/url_slug:kt00U70RG4?b-q=red%20biotechnology&b-subscription=TRUE&b-group-by=true&b-search-type=tech-reference&b-sort-on=default
- [3] ELSEVIER. Elsevier [online]. Holandsko: Elsevier, 2017 [cit. 2017-01-23]. Dostupné z: <https://www.elsevier.com/life-sciences/biotechnology>
- [4] *Uvádění GMO do oběhu*. In: . Praha: Ministerstvo životního prostředí, 2012. Dostupné také z: [http://www.mzp.cz/www/env-gmo.nsf/8dab603a304d9936c1256b61003b079c/9d387fc28d5d32acc1257a44004c7d40/\\$FILE/oeres-schvalene_GMO_smernice-2001-18-20120726.pdf](http://www.mzp.cz/www/env-gmo.nsf/8dab603a304d9936c1256b61003b079c/9d387fc28d5d32acc1257a44004c7d40/$FILE/oeres-schvalene_GMO_smernice-2001-18-20120726.pdf)
- [5] ROUDNÁ, M. *Genetické modifikace v České republice a opatření k zajištění biologické bezpečnosti* [online]. Praha: Ministerstvo životního prostředí, 2011 [cit. 2017-03-09]. ISBN 978-80-7212-566-1. Dostupné z: [http://www.mzp.cz/C1257458002F0DC7/cz/publikace_gmo/\\$FILE/oeres-geneticke_modifikace-20130425.pdf](http://www.mzp.cz/C1257458002F0DC7/cz/publikace_gmo/$FILE/oeres-geneticke_modifikace-20130425.pdf)
- [6] *Modifying flavour in food* [online]. Cambridge: Woodhead Publishing Limited, 2007 [cit. 2017-03-02]. ISBN 978-1-84569-336-7. Dostupné z: http://app.knovel.com/web/toc.v/cid:kpMFF00011/viewerType:toc/root_slug:modifying-flavour-in/url_slug:kt005FOI76?b-q=white%20biotechnology&b-subscription=TRUE&b-group-by=true&b-search-type=tech-reference&b-sort-on=default
- [7] ZÁVODSKÁ, Radka. *Biologie buněk: základy cytologie, bakteriologie, virologie*. 1. vyd. Praha: Scientia, 2006. ISBN 80-86960-15-3.
- [8] ŠILHÁNKOVÁ, Ludmila. *Mikrobiologie pro potravináře a biotechnology*. Vyd. 3., opr. a dopl., v nakl. Academia 1. vyd. Praha: Academia, 2002, 363 s. ISBN 80-200-1024-6.
- [9] ROSYPAL, Stanislav. *Přehled biologie*. 3. vyd. Praha: Scientia, 1998. ISBN 8071831107.
- [10] KAPRÁLEK, František. *Základy bakteriologie*. Praha: Karolinum, 2000. ISBN 80-7184-811-5.
- [11] JELÍNEK, Jan a Vladimír ZICHÁČEK. *Biologie pro gymnázia: (teoretická a praktická část)*. 9. vyd. Olomouc: Nakladatelství Olomouc, 2007, 575 s., [92] s. barev. obr. příl. ISBN 978-80-7182-213-4.
- [12] OBRUCA, Stanislav, Pavla BENESOVA, Sinisa PETRIK, Jana OBORNA, Radek PRIKRYL a Ivana MAROVA. Production of polyhydroxyalkanoates using hydrolysate of

spent coffee grounds. *Process Biochemistry*. 2014, **49**(9), 1409-1414. DOI: 10.1016/j.procbio.2014.05.013

[13] CHEN, Yi-Jr, Yan-Chia HUANG a Chia-Yin LEE. Production and characterization of medium-chain-length polyhydroxyalkanoates by *Pseudomonas mosselii* TO7. *Journal of Bioscience and Bioengineering*. 2014, **118**(2), 145-152. DOI: 10.1016/j.jbiosc.2014.01.012.

[14] BRAUNEGG, Gerhart, Gilles LEFEBVRE, Klaus F GENSER, et al. Polyhydroxyalkanoates, biopolyesters from renewable resources: Physiological and engineering aspects. *Journal of Biotechnology*. 1998, **65**(2-3), 42-66. DOI: 10.1021/bk-2000-0764.ch004.

[15] LAYCOCK, Bronwyn, Peter HALLEY, Steven PRATT, Alan WERKER a Paul LANT. The chemomechanical properties of microbial polyhydroxyalkanoates. *Progress in Polymer Science*. 2013, **38**(3-4), 536-583. DOI: 10.1016/j.progpolymsci.2012.06.003.

[16] SUDESH, K, H ABE, Y DOI a Chi ZHANG. Synthesis, structure and properties of polyhydroxyalkanoates: biological polyesters. *Progress in Polymer Science*. 2000, **25**(10), 1-24. DOI: 10.1002/9783527656950.ch1.

[17] Kessler, B., Witholt, B.: Factors involved in the regulatory network of polyhydroxyalkanoate metabolism. *Journal of Biotechnology*, 2001, vol. 86, pp. 97-104. ISSN 0168-1656.

[18] ROY, Ipsita a P. M., Visakh P. M., VISAKH. *Polyhydroxyalkanoate (PHA) based blends, composites and nanocomposites*. Cambridge: Royal Society of Chemistry, 2015. RSC green chemistry series, 30. ISBN 978-1-84973-946-7.

[19] ZINN, Manfred, Bernard WITHOLT a Thomas EGLI. Occurrence, synthesis and medical application of bacterial polyhydroxyalkanoate. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 2001, **53**(1), 5-21. DOI: 10.1016/s0169-409x(01)00218-6.

[20] *Introduction to Bioplastics Engineering*. Cambridge: Elsevier, 2016. ISBN 978-0-323-39396-6.

[21] MULLER, J., D. MACEACHRAN, H. BURD, et al. Engineering of *Ralstonia eutropha* H16 for Autotrophic and Heterotrophic Production of Methyl Ketones. *Applied and Environmental Microbiology*. 2013, **79**(14), 4433-4439. DOI: 10.1128/AEM.00973-13. ISSN 0099-2240. Dostupné také z: <http://aem.asm.org/cgi/doi/10.1128/AEM.00973-13>

[22] *Industrial Biorefineries and White Biotechnology*. Cambridge: Elsevier, 2015. ISBN 978-0-444-63453-5.

[23] MATTHAIU, D.K., E. CHASOU, S. ATMATZIDIS a P. TSOLKAS. A case of bacteremia due to *Burkholderia cepacia* in a patient without cystic fibrosis. *Respiratory Medicine CME*. 2011, **4**(3), 144-145. DOI: 10.1016/j.rmedc.2010.11.002. ISSN 17550017. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1755001710000606>

[24] PAN, Wenyang, Christopher T. NOMURA a James P. NAKAS. Estimation of inhibitory effects of hemicellulosic wood hydrolysate inhibitors on PHA production by

Burkholderia cepacia ATCC 17759 using response surface methodology. *Bioresource Technology*. 2012, **125**, 275-282. DOI: doi:10.1016/j.biortech.2012.08.107. ISSN 09608524. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0960852412013028>

[25] NASCIMENTO, Valkirea Matos, Luiziana Ferreira SILVA, José Gregório Cabrera GOMEZ a Gustavo Graciano FONSECA. Growth of Burkholderia sacchari LFM 101 cultivated in glucose, sucrose and glycerol at different temperatures. *Scientia Agricola*. 2016, **75**(no. 5), 429-433. DOI: 10.1590/0103-9016-2015-0196. ISBN 10.1590/0103-9016-2015-0196. Dostupné také z: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext

[26] CESÁRIO, M. Teresa, Rodrigo S. RAPOSO, M. Catarina M.D. de ALMEIDA, Frederik VAN KEULEN, Bruno S. FERREIRA, João P. TELO a M. Manuela R. da FONSECA. Production of poly(3-hydroxybutyrate-co-4-hydroxybutyrate) by Burkholderia sacchari using wheat straw hydrolysates and gamma-butyrolactone. *Elsevier*. 2014, , 1-9. DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2014.04.054. ISBN 10.1016/j.ijbiomac.2014.04.054. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0141813014002815>

[27] HAN, J., F. ZHANG, J. HOU, et al. Complete Genome Sequence of the Metabolically Versatile Halophilic Archaeon Haloferax mediterranei, a Poly(3-Hydroxybutyrate-co-3-Hydroxyvalerate) Producer. *Journal of Bacteriology*. 2012, **194**(16), 4463-4464. DOI: 10.1128/JB.00880-12. ISSN 0021-9193. Dostupné také z: <http://jb.asm.org/cgi/doi/10.1128/JB.00880-12>

[28] KOPECKÁ, JANA, DAGMAR MATOULKOVÁ a MIROSLAV NĚMEC. Yeast and its uses. *Kvasný průmysl* [online]. 2012, **58**(11-12), 4-10 [cit. 2017-01-27]. DOI: 10.18832/kp2012029. ISBN 10.18832/kp2012029. Dostupné z: <http://kvasnyprumysl.cz/doi/10.18832/kp2012029.html>

[29] Droždí. *Droždí* [online]. Olomouc, 2010 [cit. 2017-01-27]. Dostupné z: <http://www.drozdi.cz/>

[30] *Pivovarnictví* [online]. Havlíčkův Brod: Grada Publishing, a.s, 2007 [cit. 2017-01-27]. ISBN 978-80-247-6623-2. Dostupné z: https://books.google.cz/books?id=411aAgAAQBAJ&pg=PA9&dq=pivovarsk%C3%A9+kvasinky&hl=cs&source=gbp_toc_r&cad=4#v=onepage&q=pivovarsk%C3%A9%20kvasinky&f=false

[31] Pivovarské kvasnice. *Pivotéka* [online]. Olomouc, 2017 [cit. 2017-01-27]. Dostupné z: <https://www.pivoteka.cz/>

[32] *Výroba vína u malovinářů*. 2. Praha: Grada Publishing, 2010. ISBN 978-80-247-3487-3.

[33] NIR technologie [online]. 2008. [cit. 2015-05-12]. Dostupné z: <http://www.milcomservis.cz/o-nas/foss/nir-technologie>

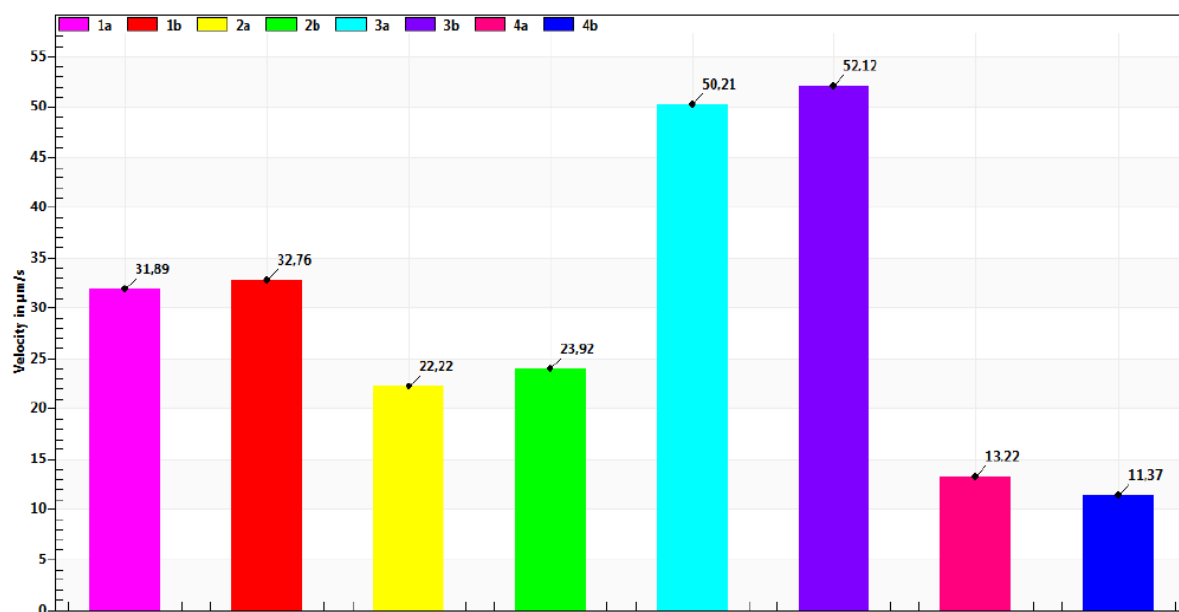
[34] LUM [online]. 2010. [cit. 2015-05-12]. Dostupné z: <http://www.lum-gmbh.com/>

- [35] KUCHLER, S., SCHNEIDER, C., LERCHE, D., SOBISCH, T.: Process optimisation for making stable emulsions using accelerated dispersion analysis by multisample analytical centrifugation. In: *LabPlus international*. 2006, s. 14-17. Dostupné z: http://www.labint-online.com/uploads/tx_ttproducts/datasheet/process-optimisation-for-making-stable-emulsions-using-accelerated-dispersion-analysis-by-multisample-analytical-centrifugation.pdf
- [36] VÁVROVÁ, Jaroslava. Odstřed'ování (centrifugace). In: *Datový standard MZ ČR*. [online]. 2009 [cit. 2017-04-19]. Dostupné z: http://ciselniky.dasta.mzcr.cz/CD_DS4/hypertext/JVACO.htm
- [37] DOSKOČIL, Leoš. Charakterizace disperzních soustav pomocí analytické odstředivky. In: *ChemPoint* [online]. Brno, 2012 [cit. 2017-04-19]. Dostupné z: <http://www.chempoint.cz/charakterizace-disperznich-soustav-pomoci-analyticke-odstredivky>
- [38] *Analytical Ultracentrifuge and Its Utilization in Biochemical Laboratory* [online]. 2010, **2010**(12) [cit. 2017-04-19]. ISSN 1213-7103. Dostupné z: http://www.chemicke-listy.cz/docs/full/2010_12_1155-1162.pdf

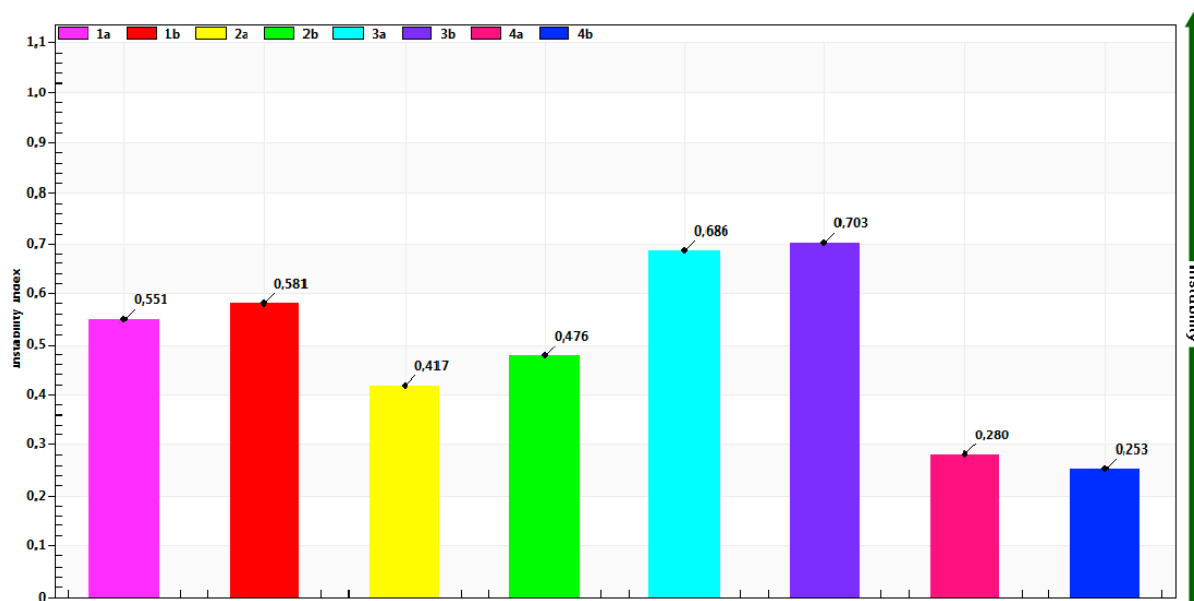
7 SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

PHA	polyhydroxyalkanoáty
GM	genetická modifikace
Bt	<i>Bacillus thuringiensis</i>
EU	Evropská unie
DNA	deoxyribonukleová kyselina
PHB	poly(3-hydroxybutyrát)
P(3-HB)	poly(3-hydroxybutyrát)
3HB	3-hydroxybutyrát
PHV	poly(3-hydroxyvalerát)
P(3-HV)	poly(3-hydroxyvalerát)
3HV	3-hydroxyvalerát
P(3HB-co-3HV)	poly(3-hydroxybutyrát-co-3-hydroxyvalerát)
P(3HB-co-4HB)	poly(3-hydroxybutyrát-co-4-hydroxybutyrát)
PP	polypropylen
GBL	gama-butyrolakton
NB	Nutrient Broth
MM	minerální médium
YPD	yeast extract peptone dextrose
FID	plamenově ionizační detektor
ISTD	interní standard
CN H16	<i>Cupriavidus necator</i> H16
CN PHB ⁻⁴	<i>Cupriavidus necator</i> PHB ⁻⁴
BuSa	<i>Burkholderia sacchari</i>
BuCe	<i>Burkholderia ceparia</i>
HM	<i>Haloferax mediterranei</i>
SC	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>

8 PŘÍLOHA



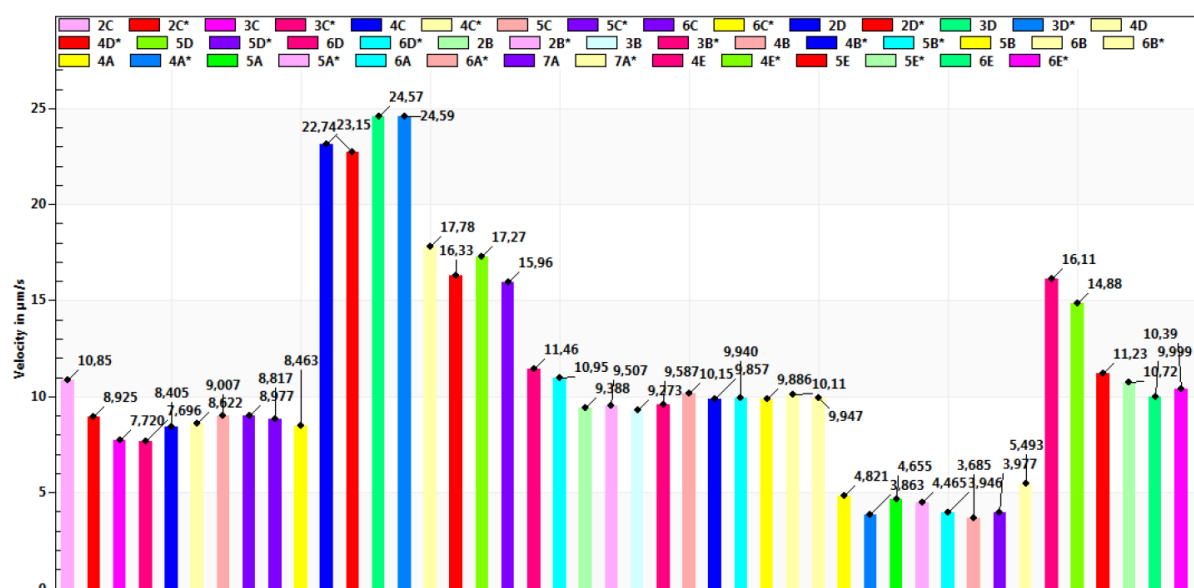
Graf 1 - Grafické znázornění rychlosti sedimentace při působení vody na bakterii *Haloferax mediterranei* v čase 400 s při transmitanci 50% a relativní centrifugační síle 530g



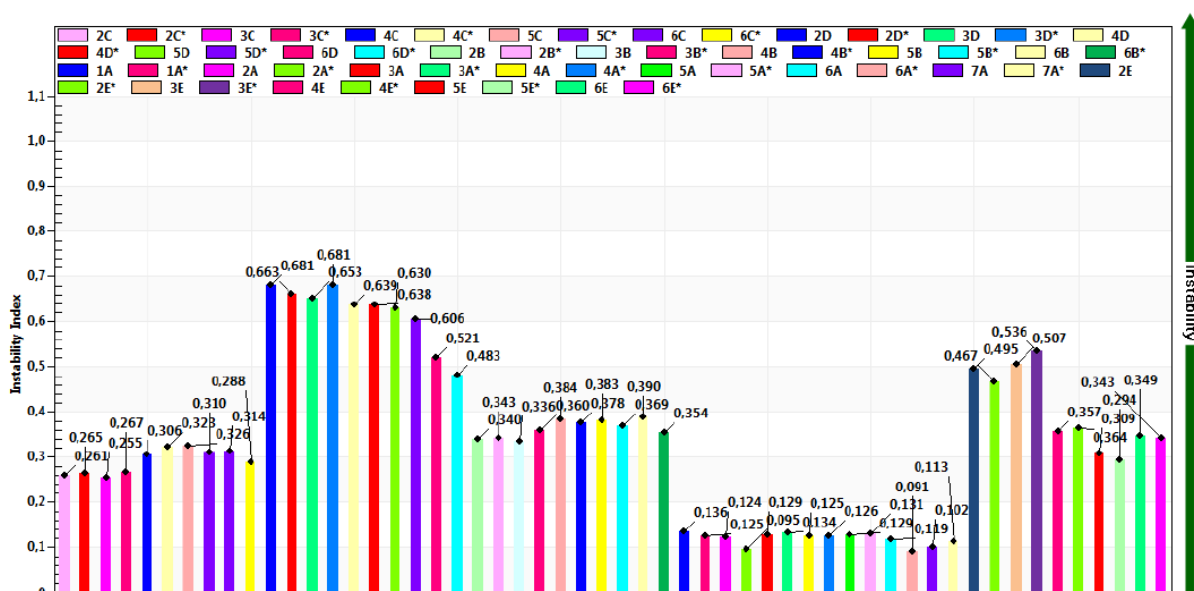
Graf 2 - Grafické znázornění indexu nestability při působení vody na bakterii *Haloferax mediterranei* čase 400 s při relativní centrifugační síle 530 g

Pozn.:

Vzorek	$V_{H. mediterranei}$ [ml]	V_{voda} [ml]
1a	2,5	2,5
1b	2,5	2,5
2a	4,0	2,0
2b	4,0	2,0
3a	2,0	4,0
3b	2,0	4,0
4a	4,0	0
4b	4,0	0



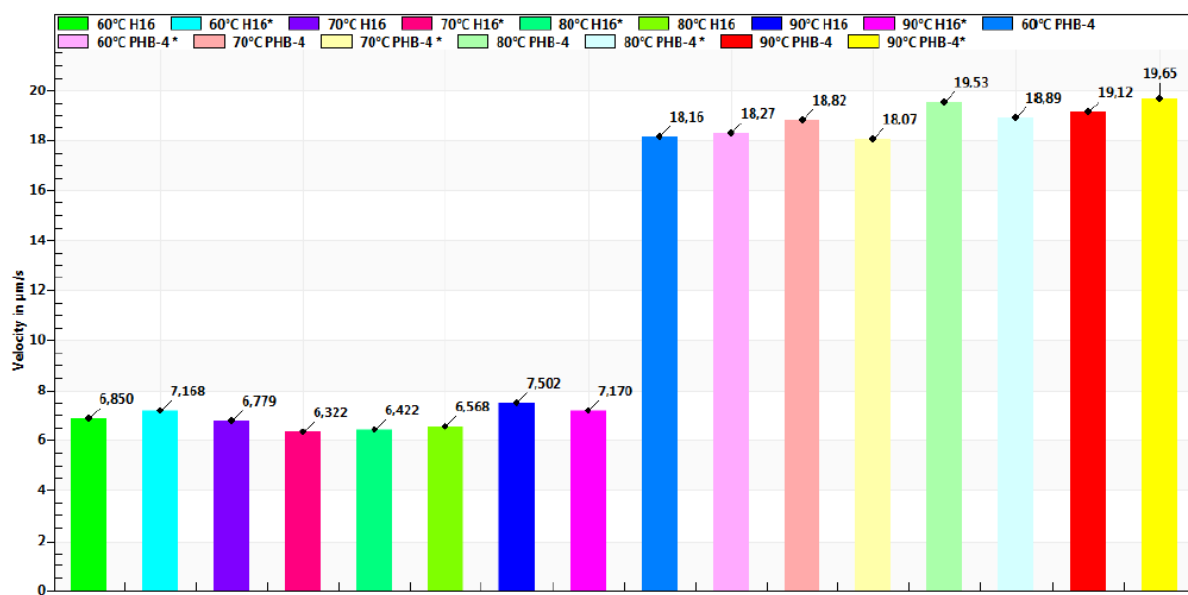
Graf 3 - Grafické znázornění rychlosti sedimentace během růstu bakterií v čase 700 s při transmitanci 45 % a relativní gravitační síle 130 g



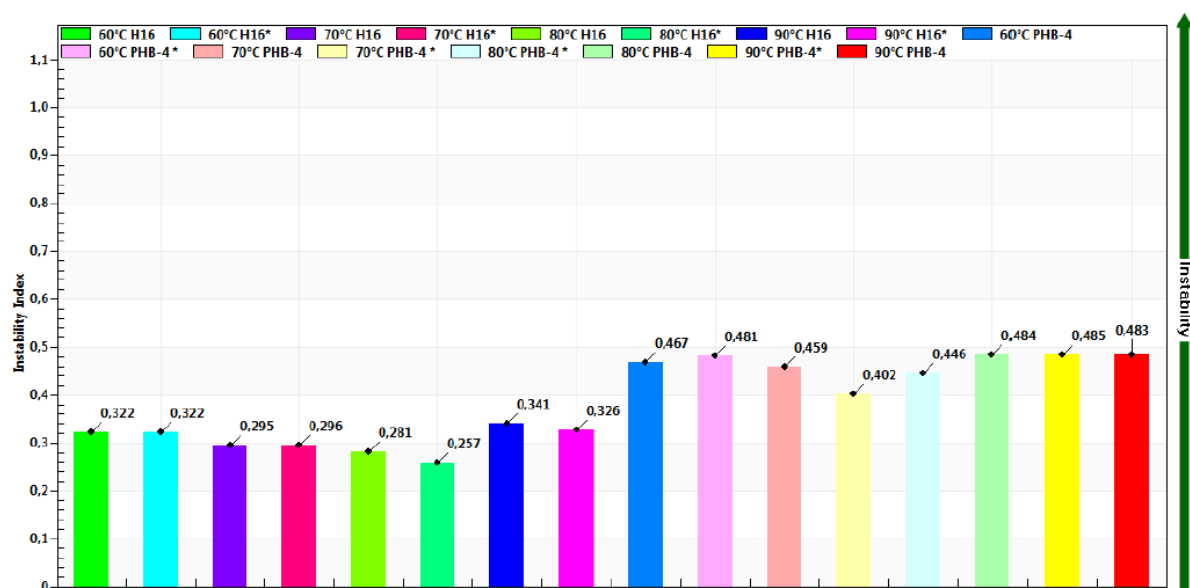
Graf 4 - Grafické znázornění indexu nestability během růstu bakterií v čase 800 s a relativní centrifugační síle 130 g

Pozn.:

Doba kultivace	<i>Burkholderia</i>	<i>Burkholderia</i>	<i>Cupriavidus</i>	<i>Cupriavidus</i>
[hod]	<i>cepacia</i>	<i>sacchari</i>	<i>necator</i> H16	<i>necator</i> PHB ⁻⁴
24	2C/2C*	2B/2B*	2D/2D*	-
30	3C/3C*	3B/3B*	3D/3D*	-
49	4C/4C*	4B/4B*	4D/4D*	4E/4E*
55	5C/5C*	5B/5B*	5D/5D*	5E/5E*
73	6C/6C*	6B/6B*	6D/6D*	6E/6E*
Doba kultivace	<i>Haloferax</i>			
[hod]	<i>mediterranei</i>			
45h	4A/4A*			
64h	5A/5A*			
70h	6A/6A*			
88h	7A/7A*			

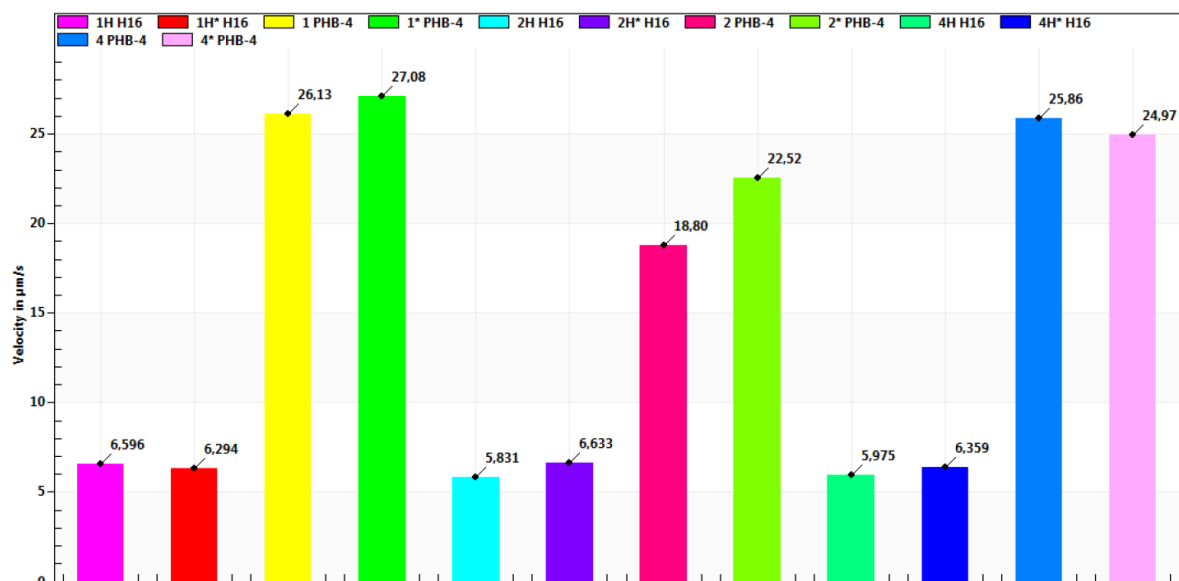


Graf 5 - Grafické znázornění rychlosti sedimentace při teplotním stresu v čase 1 000 s při transmitanci 35 % a relativní gravitační síle 130 g

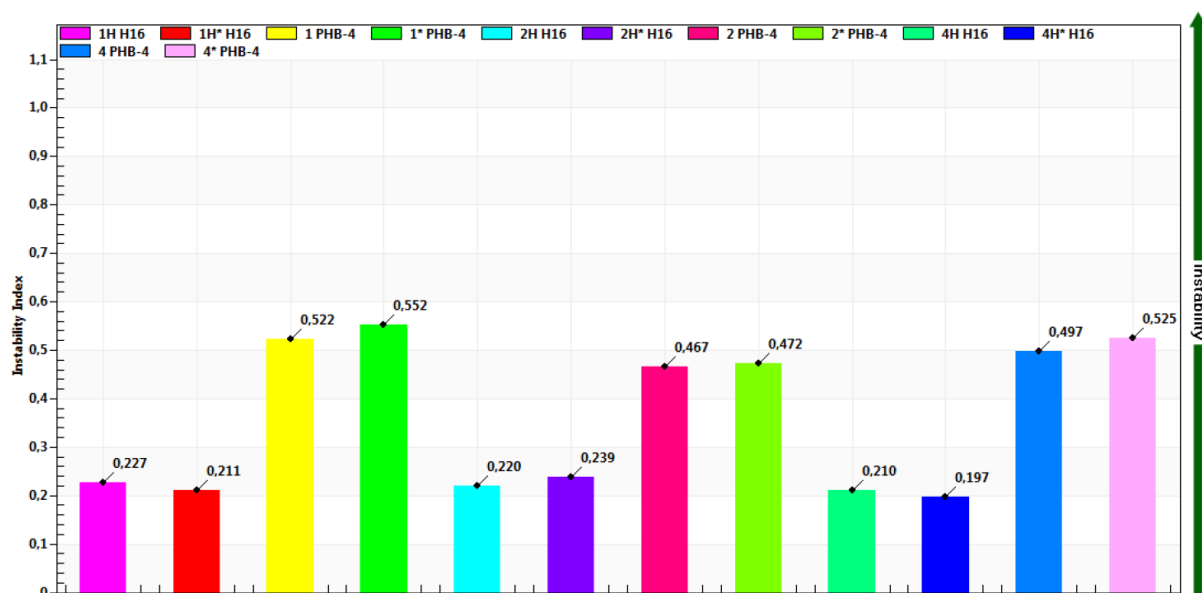


Graf 6 - Grafické znázornění indexu nestability při působení teplotního stresu v čase 1 000 s a relativní centrifugační síle 130 g

Pozn.: H16 – *Cupriavidus necator* H16, PHB-4 – *Cupriavidus necator* PHB⁻⁴



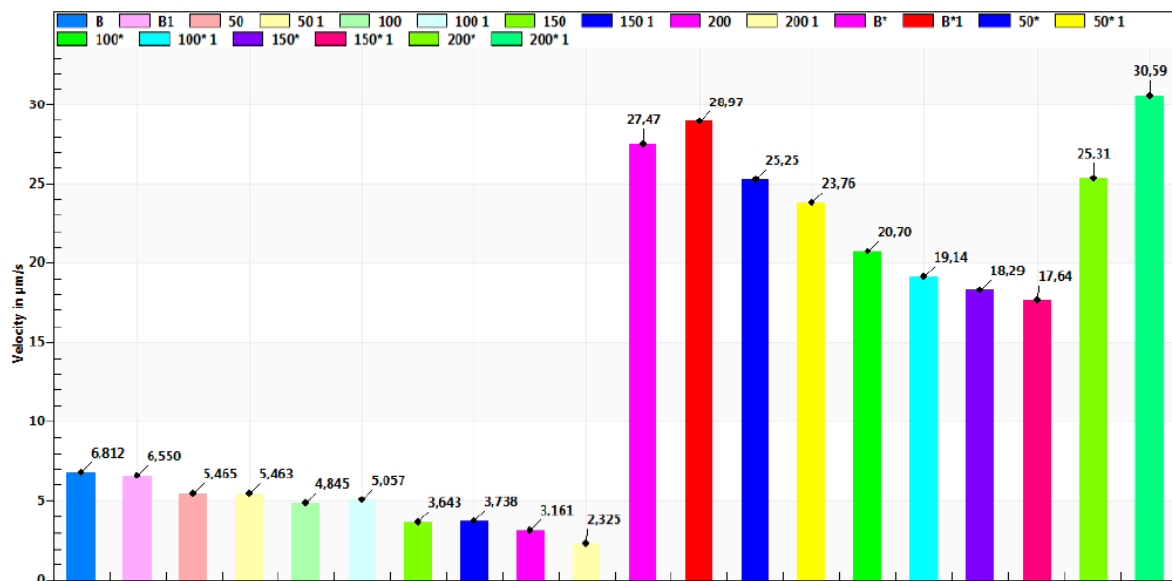
Graf 7 - Grafické znázornění rychlosti sedimentace při působení stresu mrazem v čase 500 s při transmitanci 50 % a relativní gravitační síle 120 g



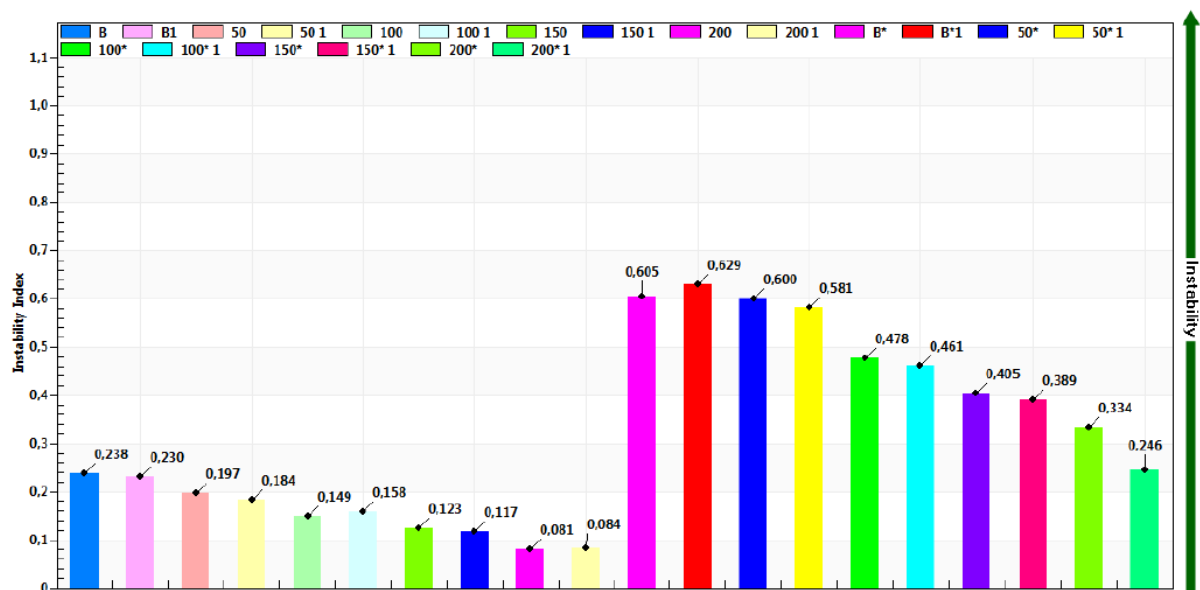
Graf 8 - Grafické znázornění indexu nestability při působení stresu mrazem v čase 500 s a při relativní centrifugační síle 130 g

Pozn.:

Vzorek	Doba mražení [hod]	
1H H16/1H* H16	1	<i>Cupriavidus necator</i> H16
2H H16/2H* H16	2	
4H H16/4H* H16	4	
1 PHB ⁻⁴ /1* PHB ⁻⁴	1	<i>Cupriavidus necator</i> PHB ⁻⁴
2 PHB ⁻⁴ /2* PHB ⁻⁴	2	
4 PHB ⁻⁴ /4* PHB ⁻⁴	4	



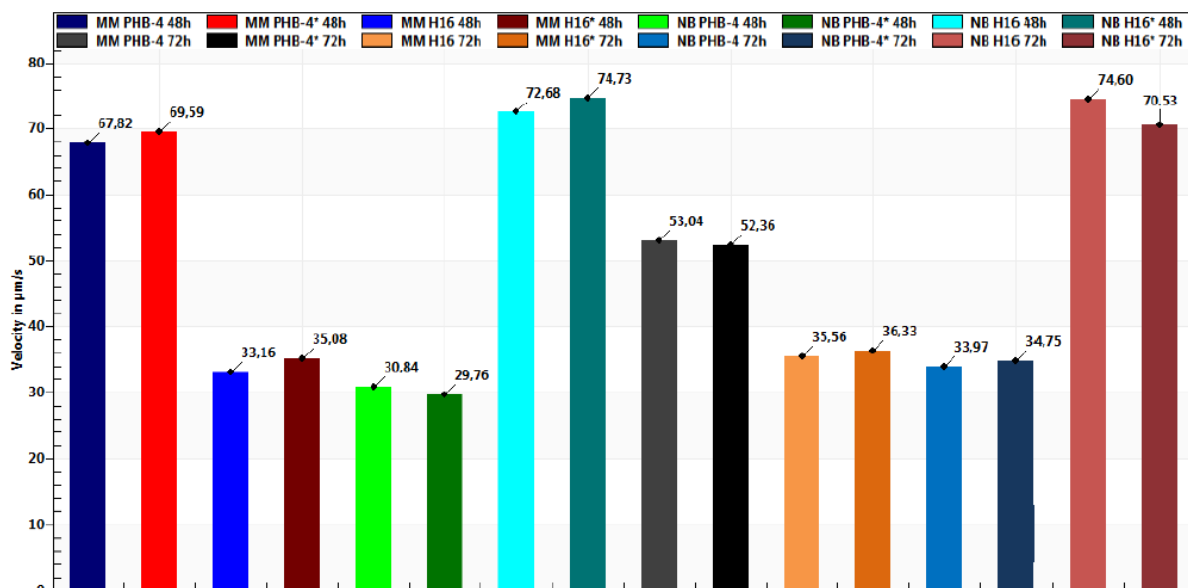
Graf 9 - Grafické znázornění rychlosti sedimentace při působení solného stresu v čase 500 s při transmitanci 40 % a relativní centrifugační síle 120 g



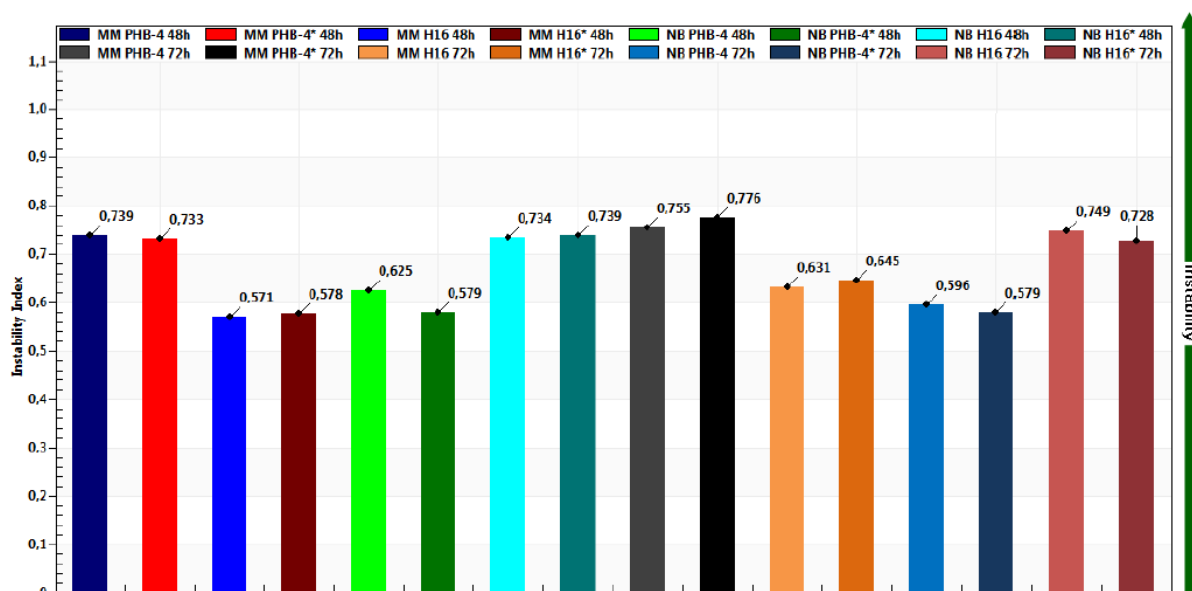
Graf 10 - Grafické znázornění indexu nestability při působení solného stresu v čase 700 s a při relativní centrifugační síle 130 g

Pozn.:

Vzorek	Koncentrace soli [g/l]	
B/B 1	Blank	
50/50 1	50	
100/100 1	100	<i>Cupriavidus</i>
150/150 1	150	<i>necator</i> H16
200/200 1	200	
B*/B* 1	Blank	
50*/50* 1	50	
100*/100* 1	100	<i>Cupriavidus</i>
150*/150* 1	150	<i>necator</i> PHB ⁻⁴
200*/200* 1	200	

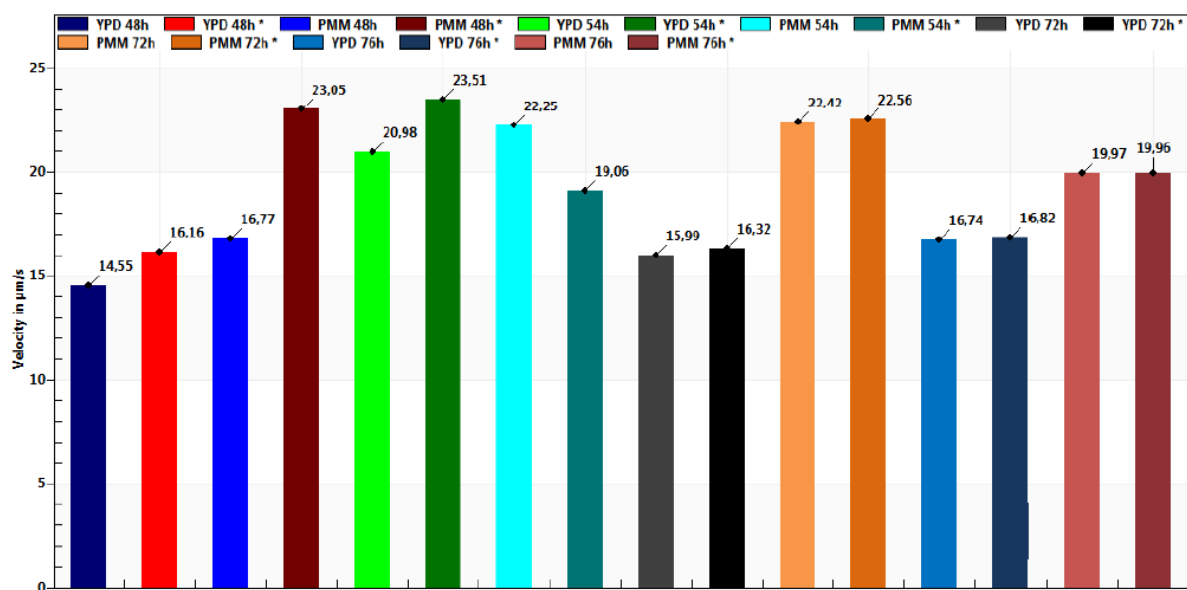


Graf 11 - Grafické znázornění rychlosti sedimentace při různém složení kultivačního média v čase 400 s při transmitanci 65 % a relativní centrifugační síle 530 g

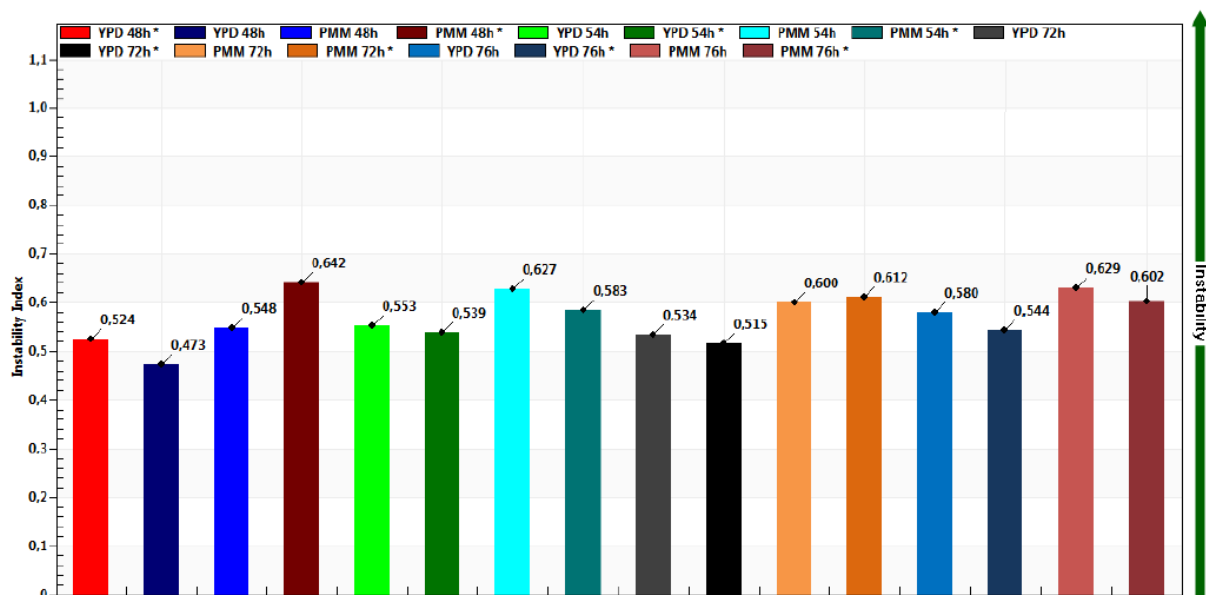


Graf 12 - Grafické znázornění indexu nestability při různém složení kultivačního média v čase 400 s a relativní centrifugační síle 530 g

Pozn.: MM – minerální médium, NB – Nutrient Broth, H16 – *Cupriavidus necator* H16, PHB⁻⁴ – *Cupriavidus necator* PHB⁻⁴



Graf 13 - Grafické znázornění rychlosti sedimentace sledování růstu kvasinky *Saccharomyces cerevisiae* v různých médiích v čase 800 s při transmitanci 55 % a relativní centrifugační síle 5,0 g



Graf 14 - Grafické znázornění indexu nestability při sledování růstu kvasinky *Saccharomyces cerevisiae* v různých médiích v čase 800 s a relativní centrifugační síle 5,0 g

Pozn.:

YPD – YPD médium, PMM – minerální médium